

POLYNUCLEOTIDE MATRIX-BASED METHOD OF IDENTIFYING MICROORGANISMS

Publication number: JP2002542808T

Publication date: 2002-12-17

Inventor:

Applicant:

Classification:







- international: G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/09;
C12Q1/68; G01N33/566; G01N37/00; C12R1/01;
G01N33/53; C12M1/00; C12M1/34; C12N15/09;
C12Q1/68; G01N33/566; G01N37/00; (IPC1-7):
C12N15/09; C12M1/00; C12M1/34; C12Q1/68;
G01N33/53; G01N33/566; G01N37/00; C12Q1/68;
C12R1/01

- european: C12Q1/68M10B

Application number: JP20000615411T 20000503

Priority number(s): US19990132411P 19990503; US19990150149P
19990820; WO2000US12421 20000503

Also published as:

 WO0066789 (A3)
 WO0066789 (A2)
 EP1177318 (A3)
 EP1177318 (A2)
 EP1177318 (A0)
 CA2370255 (A1)
 AU2005200846 (A1)
 AU778230 (B2)

less <<

Report a data error here

Abstract not available for JP2002542808T

Abstract of corresponding document: **WO0066789**

Method of identifying microbial organisms wherein a biological sample containing nucleic acids is hybridized with a collection of polynucleotide probes, each probe having binding specificity for the ribosomal nucleic acids of at least one microbe. The collection of probes is organized into a series of "addresses" that provide information about the presence or absence of one or more polynucleotide sequences in the biological sample. Probes in the matrix are selected to distinguish between organisms that differ from each other by a known phylogenetic relationship. Advantageously, the invented method can detect and resolve the identities of microorganisms that are present in a mixed culture. The system is particularly suited to automated analysis.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2002-542808
(P2002-542808A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		1/34	4 B 0 2 9
1/34		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 113 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-615411(P2000-615411)	(71)出願人	ジェン-プローブ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州92121- 4362, サン・ディエゴ, ジネティク・セン ター・ドライブ 10210, パテント・デバ ートメント
(86) (22)出願日	平成12年5月3日(2000.5.3)	(72)発明者	ホーガン, ジェームズ・ジェイ アメリカ合衆国カリフォルニア州92118, コロナド, オリーブ・レーン 1038
(85)翻訳文提出日	平成13年11月5日(2001.11.5)	(74)代理人	弁理士 社本 一夫 (外5名)
(86)国際出願番号	P C T / U S 0 0 / 1 2 4 2 1	F ターム(参考)	4B024 AA11 AA13 CA09 CA11 HA14 4B029 AA07 AA21 AA23 BB01 BB20 CC03 CC08 FA01 FA03 FA15 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR56 QR84 QS34 QS39
(87)国際公開番号	W O 0 0 / 6 6 7 8 9		
(87)国際公開日	平成12年11月9日(2000.11.9)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 3 2 , 4 1 1		
(32)優先日	平成11年5月3日(1999.5.3)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 5 0 , 1 4 9		
(32)優先日	平成11年8月20日(1999.8.20)		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチドマトリックスに基づく微生物同定方法

(57)【要約】

本発明は、核酸を含有する生物試料をポリヌクレオチドプローブのコレクションとハイブリダイズさせる微生物同定方法である。各プローブは少なくとも1つの微生物のリボソーム核酸に対する特異性を有する。プローブのコレクションは、生物試料中の1またはそれ以上のポリヌクレオチド配列の存在または不存在についての情報を提供する一連の”アドレス”に組織化されている。マトリックス中のプローブは、既知の系統発生関係により互いに異なる微生物を識別するように選択される。有利には、本発明方法は混合培養物中に存在する微生物を検出し、そのアイデンティティを解明することができる。本発明の系は特に自動分析に適する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記のものを含む、核酸をハイブリダイズするためのデバイス：

固体支持体；ならびに

固体支持体上に配置した複数のアドレス（address）：各アドレスは少なくとも1つの微生物種に由来するリボソーム核酸を高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも1つのプローブを含み、複数のアドレスは下記のものを含む：

高次（higher-order）アドレス、

中次（intermediate-order）アドレス、および

低次（lower-order）アドレス；

これらにおいて、

低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズし、かつ

中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。

【請求項2】 固体支持体が、マルチウェルプレート、およびそれぞれ間隔をおいた配置に維持された複数の個別試験管よりなる群から選択される、請求項1に記載のデバイス。

【請求項3】 高次アドレスが、複数のグラム陽性（Gram⁽⁺⁾）細菌種、腸内（Enterobacteriaceae）細菌科の複数の細菌種、腸球菌（Enterococcus）属の複数の細菌種、ブドウ球菌（Staphylococcus）属の複数の細菌種、およびカンピロバクター属の複数の細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎細菌（pan-bacterial）アドレスである、請求項1に記載のデバイス。

【請求項4】 高次アドレスが、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレスである、請求項1に記載のデバイス

【請求項5】 さらに、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレスを含む、請求項3に記載のデバイス。

【請求項6】 高次アドレスが、複数のグラム陽性細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレスである、請求項1に記載のデバイス。

【請求項7】 中次アドレスが、複数のグラム陽性細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレス、腸内細菌科の複数の細菌に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする腸内細菌科アドレス、ブドウ球菌属の複数の種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするブドウ球菌属アドレス、腸球菌属の複数の種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする腸球菌属アドレス、および複数のカンピロバクター属菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするカンピロバクター属アドレスよりなる群から選択される、請求項3または5に記載のデバイス。

【請求項8】 中次アドレスがグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスが高（G+C）サブセットのグラム陽性細菌に属する複数の細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする放線菌（*Actinomycetes*）類アドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項9】 中次アドレスがグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスが複数のマイコバクテリウム属菌（*Mycobacterium*）種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項10】 複数のマイコバクテリウム属菌種が結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、マイコバクテリウム・ボビス（*Mycobacterium bovis*）、マイコバクテリウム・ボビスBCGおよびマイコバクテリウム・アフリカヌム（*Mycobacterium africanum*）を含む、請求項9に記載のデバイス。

【請求項11】 中次アドレスがグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスが肺炎連鎖球菌（*Streptococcus pneumoniae*）のり

ボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項12】 中次アドレスがグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスがリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項13】 中次アドレスがグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスが黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項14】 中次アドレスが腸内細菌科アドレスであり、低次アドレスが大腸菌 (*E. coli*) のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする大腸菌アドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項15】 中次アドレスがブドウ球菌属アドレスであり、低次アドレスが黄色ブドウ球菌に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする黄色ブドウ球菌アドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項16】 中次アドレスが腸球菌属アドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項17】 中次アドレスがカンピロバクター属アドレスである、請求項7に記載のデバイス。

【請求項18】 低次アドレスが、結核菌、マイコバクテリウム・ボビス、マイコバクテリウム・ボビスBCGおよびマイコバクテリウム・アフリカヌムに由来するリボソーム核酸を検出するアドレスである、請求項6に記載のデバイス。

【請求項19】 中次アドレスが、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダ・デュブリニエンシス (*Candida dubliniensis*)、カンジダ・ビスワナチイ (*Candida viswanathii*) およびカンジダ・パラプシローシス (*Candida paraps*

i l o s i s) を含む複数のカンジダ属菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズし、低次アドレスが、カンジダ・アルビカンズおよびカンジダ・デュブリニエンシスに由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするが、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ビスワナチイまたはカンジダ・パラブシローシスに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズしない、請求項4に記載のデバイス。

【請求項20】 さらに、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする汎真菌アドレスを含む、請求項8に記載のデバイス。

【請求項21】 複数のアドレスがさらに、腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項22】 複数のアドレスがさらに、腸球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項23】 複数のアドレスがさらに、腸球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項21に記載のデバイス。

【請求項24】 さらに、腸球菌属細菌のリボソーム核酸および腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレスを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項25】 複数のアドレスがさらに、ブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項26】 複数のアドレスがさらに、カンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項27】 複数のアドレスがさらに、カンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項25に記載のデバイス。

【請求項28】 複数のアドレスがさらに、ブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレス、およびカンピロバクター属の複数

の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む、請求項23に記載のデバイス。

【請求項29】 複数のアドレスがさらに、ブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレスを含む、請求項24に記載のデバイス。

【請求項30】 複数のアドレスがさらに、単一微生物種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする少なくとも1つのアドレスを含む、請求項28に記載のデバイス。

【請求項31】 単一微生物種が、大腸菌、肺炎連鎖球菌、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、カンジダ・アルビカンスおよび黄色ブドウ球菌よりなる群から選択される、請求項30に記載のデバイス。

【請求項32】 複数のアドレスがさらに、複数の微生物種に由来するリボソーム核酸を個別にハイブリダイズする複数のアドレスを含む、請求項29に記載のデバイス。

【請求項33】 汎細菌アドレスが、配列番号：1および配列番号：58よりなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項34】 汎真菌アドレスが、配列番号：4の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項35】 グラム陽性菌アドレスが、配列番号：7の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項36】 放線菌類アドレスが、配列番号：10の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項37】 汎細菌アドレスが配列番号：1および配列番号：58よりなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドプローブを含み、汎真菌アドレスが配列番号：4の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含み、グラム陽性菌アドレスが配列番号：7の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含み、放線菌類アドレスが、配列番号：10の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む、請求項20に記載のデバイス。

【請求項38】 少なくとも1つのプローブがそれぞれアクリジニウムエステルで標識されている、請求項1に記載のデバイス。

【請求項39】 微生物を含有する疑いのある生物試料を分析するための、下記の工程を含む方法：

生物試料を入手し；

該生物試料に含有されるいずれかの微生物の数が増加する期間、試料を培養し；

培養した生物試料中のいずれかの微生物からポリヌクレオチドを放出させ；

放出されたポリヌクレオチドを高ストリンジェント条件下でプローブマトリックスとハイブリダイズさせ、その際ポリヌクレオチドプローブマトリックスは複数のアドレスを含み、各アドレスは1またはそれ以上の微生物種に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする少なくとも1つのプローブを含み、複数のアドレスは下記のものを含む：

高次アドレス、

中次アドレス、および

低次アドレス；

これらにおいて、

低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズし、かつ

中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする；

複数のアドレスのそれぞれに対する陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果を検出してハイブリダイゼーションプロフィールを確立し；そして

微生物のアイデンティティーを各アドレスにおけるハイブリダイゼーション結果と相関させたルックアップ表と、該ハイブリダイゼーションプロフィールを比較し、これにより生物試料に含有される微生物のアイデンティティーに関する情報を得る。

【請求項40】 高ストリンジェント条件下でハイブリダイズさせる工程が、0.6MのLiCl、1%のラウリル硫酸リチウム、60mMのコハク酸リチウム、ならびに各10mMのEDTAおよびEGTAを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 ハイブリダイゼーション工程の高次アドレスが、複数のグラム陽性細菌種、腸内細菌科の複数の細菌種、腸球菌属の複数の細菌種、ブドウ球菌属の複数の細菌種、およびカンピロバクター属の複数の細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎細菌アドレスであり、ハイブリダイゼーション工程の複数のアドレスがさらに、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレスを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 ハイブリダイゼーション工程の中次アドレスが複数のグラム陽性細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレスであり、ハイブリダイゼーション工程の低次アドレスが高(G+C)サブセットのグラム陽性細菌に属する複数の細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする放線菌類アドレスである、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 入手工程の生物試料が、菌血症、敗血症および真菌血症よりなる群から選択される医学的状态について検査される個体から採取した血液試料であり、培養工程が、血液ボトルに該血液試料の一部を接種し、次いで接種した血液ボトルをインキュベートすることを含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 検出工程がルミノメトリー(luminometry)による検出を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 リボソーム核酸を含有する試料を分析するための、下記の工程を含む方法：

試料を高ストリンジェント条件下でプローブマトリックスとハイブリダイズさせてハイブリダイズした試料にし、その際プローブマトリックスは下記のものを含む複数のアドレスを含み：

高次アドレス、

中次アドレス、および

低次アドレス；

これらにおいて、

低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズし、かつ

中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする；

ハイブリダイズした試料を分析して、試料中に存在するリボソーム核酸に相補的な少なくとも1つのプローブを含む第1アドレスコレクションを同定し、かつ試料中に存在するリボソーム核酸に相補的な少なくとも1つのプローブを含まない第2アドレスコレクションを同定し；そして

分析工程で同定した第1および第2アドレスコレクションから、どの微生物コレクションが対応するプロフィールのリボソーム核酸配列を有するリボソーム核酸を保有するかを判定し、これによりRNA含有試料の微生物源を判定する。

【請求項46】 ハイブリダイゼーション工程の高次アドレスが、複数のグラム陽性細菌種、腸内細菌科の複数の細菌種、腸球菌属の複数の細菌種、ブドウ球菌属の複数の細菌種、およびカンピロバクター属の複数の細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎細菌アドレスであり、ハイブリダイゼーション工程の複数のアドレスがさらに、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレスを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 ハイブリダイゼーション工程の中次アドレスが複数のグラム陽性細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレスであり、ハイブリダイゼーション工程の低次アドレスが高（G+C）サブセットのグラム陽性細菌に属する複数の細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする放線菌類アドレスである、請求項46に記載の方法。

【請求項48】 分析工程がルミノメトリーによる検出を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 ハイブリダイゼーション工程を55～65℃で実施する、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作で得た結果を分析するための、下記のものを含むデバイス：

ルックアップ表を記憶させたメモリーデバイス；該ルックアップ表は複数の微生物のアイデンティティーをプローブマトリックス中の複数のアドレスにおける陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果と相関させたものであり、複数のアドレスは少なくとも下記のものを含み：

高次アドレス、

中次アドレス、および

低次アドレス；

これらにおいて、

低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズし、かつ

中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする；

メモリーデバイスに接続されたプロセッサ：該プロセッサはプロセッサに入力された結果と該ルックアップ表の比較を行うように設定され、該結果は、微生物から放出させたポリヌクレオチドに対する、プローブマトリックス中の複数のアドレスにおける陽性および陰性のハイブリダイゼーションを示すものである；

比較を開始するためにプロセッサに接続されたユーザーインターフェース；および

比較の結果を表示するためにプロセッサに接続された出力デバイス。

【請求項51】 メモリーデバイスが磁気記憶媒体を含む、請求項50に記載のデバイス。

【請求項52】 ユーザーインターフェースが、陽性および陰性のハイブリ

ダイゼーション結果をプロセッサに入力するためのキーボードを含む、請求項50に記載のデバイス。

【請求項53】 さらに、陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果をプロセッサに入力するためのインターフェースを介してプロセッサに接続されたプローブハイブリダイゼーション検出器を含む、請求項50に記載のデバイス。

【請求項54】 検出器がルミノメーターを含む、請求項53に記載のデバイス。

【請求項55】 出力デバイスが視覚表示モニターまたはプリンターである、請求項50に記載の自動デバイス。

【請求項56】 細菌試料が黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属菌種を含有するかを判定するための、下記の工程を含む方法：

細菌試料からポリヌクレオチドを放出させて、放出ポリヌクレオチドを採集し；

採集した放出ポリヌクレオチドを、ブドウ球菌属細菌のリボソーム核酸に対する特異性を有する第1プローブ、および黄色ブドウ球菌のリボソーム核酸に対する特異性を有する第2プローブとハイブリダイズさせ；

採集した放出ポリヌクレオチドとハイブリダイズする第1または第2プローブを検出し；そして

第1プローブがハイブリダイズし、第2プローブがハイブリダイズしなかった場合には、該細菌試料が黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属菌種を含有すると判定する。

【発明の詳細な説明】**【0001】**関連出願

本発明は、米国仮特許出願60/132, 411（1999年5月3日出願）、および米国仮特許出願60/150, 149（1999年8月20日出願）の権利を主張する。これら関連出願の開示内容を本明細書に援用する。

【0002】発明の分野

本発明は、微生物を同定するための方法、組成物およびデバイスに関する。より詳細には、本発明は微生物種または微生物グループを分子系統発生に基づいて互いに識別するリボソーム核酸（rRNAおよびrDNA）に対する特異性をもつポリヌクレオチドプローブのマトリックスの使用に関する。

【0003】発明の背景

感染性生物を検出および同定するための方法は、臨床検査室で行う最も重要な職務の一部である。以前は感染性疾患の検査室診断は染色した臨床材料の視覚検査を用いる、経験をつんだ技術により行われていたが、現代の技術を用いるとより迅速で客観的な結果が得られる。ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫アッセイ、ならびにラテックス凝集アッセイおよびイムノプロットティングアッセイを含めたイムノアッセイ法が開発され、モノクローナル抗体の利用によって増強された有用性をもつ強力な診断道具となった。より最近のシグナルおよび標的の増幅の進歩によって、ポリヌクレオチドプローブの使用に基づく分子診断の段階に入った。

【0004】

事実、臨床微生物関係者は現在では感染性生物の同定のために広範な一連の技術を用いている（参照：Manual of Clinical Microbiology, Murray et al. 編, 第6版, ASM Press（1995））。自動化された基質利用システムは、一般に色素原もしくは蛍光原化合物を放出させる酵素反応、種々の炭素源の存在下でのテトラゾリウム系の代

謝活性指示薬、または酸系代謝産物の検出に依存している。これらの基質を用いた陽性および陰性の反応パターンは、臨床試料から分離した微生物の同定に使用できる生化学的プロフィールを形成する。細菌および酵母における脂質形成に関与する300種類を超える脂肪酸のクロマトグラフィープロフィールも、微生物の表現型判定に利用されている。これらのきわめて強力な技術を利用できるにもかかわらず、ポリヌクレオチドに基づくアッセイが臨床検査室の業務では急速に普及している。

【0005】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション反応の特異性と、核酸増幅技術により得られるきわめて高い感度により、分子診断法はごく少量得られる微生物を検出および同定するための好ましい方法となった。一般に用いられるDNAプローブハイブリダイゼーション方式には、固相ハイブリダイゼーション、溶液相ハイブリダイゼーションおよび*in situ*ハイブリダイゼーションが含まれる。固相ハイブリダイゼーション法では、微生物ポリヌクレオチドを含有する試料を固体支持体に固定化し、変性させ、次いで検出可能な標識を含むポリヌクレオチドプローブで探査する。ハイブリダイズしていないプローブを系から除去し、特異的にハイブリダイズしたプローブをオートラジオグラフィーまたは直接視覚観察により検出する。溶液相ハイブリダイゼーション法では、標的ポリヌクレオチドと標識プローブが水性ハイブリダイゼーション緩衝液中で自由に相互作用できる。次いで特異的にハイブリダイズしたプローブを、混合物中の標的ポリヌクレオチドの存在を指示するものとして検出する。微生物の物理的分布および量についての情報を得るためには、ホルマリン固定切片を用いる*in situ*ハイブリダイゼーションを利用する。分子診断アッセイ法は簡便に実施できるので、検査中の生物試料中に特定の種またはグループの生物が存在するか否かを判定するために行われる。

【0006】

菌血症および真菌血症は、循環血中に細菌性および真菌性の生物が存在することを特色とする状態である。敗血症は、全身に及ぶ血液中に拡散した重度の細菌感染を表す。敗血症の場合、血液中に微生物が存在するのは宿主の免疫系が感染

を局在化できなかったことを示す。これらの状態に關与する生物は、一般に”血液培養ボトル”に患者の血液試料を接種した後、次いで増殖した微生物のタイプを調べることにより同定される。血流感染症に關連する死亡率は20～50%と推定される（参照：Clinics in Laboratory Medicine, 14:9 (1994)）。米国では毎年推定50,000人の死亡が敗血症により起きている（Vanderbilt Univ. Med. Center Reporter, 1991年3月1日, 2(8):1, 3）。したがって、この症候群の診断および処置に多くの関心が向けられた。

【0007】

残念ながら、敗血症診断のための”最良の方法”である血液培養法には重大な制限がある（Weinstein, Clin. Infect. Dis., 23:40 (1996)）。事実、可能性のある血流生物すべてを増殖させるのに理想的な単一培地はなく、ある關連微生物は慣用の培地および系では増殖が低く、陽性の結果を得るには数時間ないし数日間のインキュベーションを必要とする。敗血症の診断がより迅速かつ正確になれば、この分野それぞれに改善が得られる。

【0008】

種特異的DNAプローブのコレクションを用いる分子診断法が、血液培養物中の微生物を同定するために利用されている。1方法によれば、増殖陽性培養ボトル中に存在する微生物をまず分離し、次いでグラム染色し、形態分析した（Davis et al., J. Clin. Microbiol., 29:2193 (1991)）。染色微生物の外観から、その後の検査工程で数種類のポリヌクレオチドのうちどれを使用するかを判断した。陽性のハイブリダイゼーション結果が得られた場合、推論により同定された。陰性のハイブリダイゼーション結果を与えた細菌の同定は、グラム染色および顕微鏡分析による観察に限定された。これらの検査で、血液培養ボトルから直接採取した細菌の迅速同定にDNAプローブを使用できることは確認されたが、経験をつんだ微生物関係者によるグラム染色微生物の評価がなお必要であった。重要な点であるが、多重微生物による菌血症は、利用できるプローブが無いいためこの方法では分析できなかった。

【0009】

敗血症患者から得た数百例の陽性血液培養物の研究で、Weinsteinら (Clin. Infect. Dis., 24:584 (1997)) は、最も一般的な5つの病原体が、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、コアグラゼ陰性ブドウ球菌属、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) および腸球菌属 (*Enterococcus*) 菌種であると結論した。酵母も血液培養ボトルから一般的に分離され、その時点で約92%検出された場合は真の真菌血症であった。カンジダ・アルビカンスは敗血症を引き起こす上位10種類の微生物に含まれる。興味深いことに、菌血症および真菌血症の症例の約91%が単一微生物性であり、残りの症例が2または3種類の微生物を伴っていた。陽性血液培養を示した患者のうち最低の関連死亡率はコアグラゼ陰性ブドウ球菌属 (5.5%)、最高は酵母および真菌 (35.8%) を伴っていた。最も重大な敗血症関連死亡率は、不適切な抗微生物療法期間に比例して増大することが示された。この所見から、初期の適切な臨床診断の重要性が明らかになった。

【0010】

以下に詳述する本発明は、自動分析に適した技術を用いて微生物を同定するための迅速な手段を提供する。本発明のデバイスおよび方法は、混合微生物集団中に含まれる微生物のアイデンティティーを解明するためにも使用できる。

【0011】

発明の概要

本発明の1側面は、核酸をハイブリダイズするためのデバイスに関する。本発明のデバイスは、固体支持体、および固体支持体上に配置した複数のアドレスを含む。各アドレスは、少なくとも1つの微生物種に由来するリボソーム核酸を高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも1つのプローブを含む。複数のアドレスは、高次アドレス (higher-order address)、中次アドレス (intermediate-order address)、および低次アドレス (lower-order address) を含む。低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズ

するリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。特定の態様において、デバイスの固体支持体は、マルチウェルプレート、またはそれぞれ間隔をおいた配置に維持された複数の個別試験管である。特定の好ましい態様において、高次アドレスは、複数のグラム陽性細菌種、腸内細菌科 (*Enterobacteriaceae*) の複数の細菌種、腸球菌属 (*Enterococcus*) の複数の細菌種、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus*) の複数の細菌種、およびカンピロバクター属 (*Campylobacter*) の複数の細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎細菌アドレス (*pan-bacterial address*) である。他の態様において高次アドレスは、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレス (*pan-fungal address*) である。本発明デバイスの特定の態様は、高次アドレスとしての汎細菌アドレス、および汎真菌アドレスの両方を含む。高次アドレスは、複数のグラム陽性細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレスであってもよい。高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、中次アドレスは、複数のグラム陽性細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレス、腸内細菌科の複数の細菌に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする腸内細菌科アドレス、ブドウ球菌属の複数の種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするブドウ球菌属アドレス、腸球菌属の複数の種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする腸球菌属アドレス、またはカンピロバクター属の複数の種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするカンピロバクター属アドレスであってよい。好ましい態様において、中次アドレスはグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスは高 (G+C) サブセットのグラム陽性細菌に属する複数の細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする放線菌類 (*Actinomycetes*) アドレスである。他の好ましい態様において、中次アドレスはグラム陽性菌アドレスであり、

低次アドレスは複数のマイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*) 菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである。複数のマイコバクテリウム属菌種には、たとえば結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ボvis (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム・ボvis BCGおよびマイコバクテリウム・アフリカヌム (*Mycobacterium africanum*) が含まれる。さらに他の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、中次アドレスはグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスは肺炎連鎖球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである。さらに別の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、中次アドレスはグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスはリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスである。本発明のさらに別の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、中次アドレスは腸内細菌科アドレスであり、低次アドレスは大腸菌 (*E. coli*) のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする大腸菌アドレスである。別の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、低次アドレスは黄色ブドウ球菌に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする黄色ブドウ球菌アドレスである。別の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、中次アドレスは腸球菌属アドレ

スである。別の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、汎真菌生物を検出するためのアドレスが含まれるか否かに関係なく、中次アドレスはカンピロバクター属アドレスである。他の好ましいデバイスにおいて、高次アドレスはグラム陽性菌アドレスであり、低次アドレスは、結核菌、マイコバクテリウム・ボビス、マイコバクテリウム・ボビスBCGおよびマイコバクテリウム・アフリカヌムに由来するリボソーム核酸を検出するアドレスである。さらに他のデバイスにおいて、高次アドレスは汎真菌アドレスであり、中次アドレスは、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダ・デュブリニエンシス (*Candida dubliniensis*)、カンジダ・ビスワナチイ (*Candida viswanathii*) およびカンジダ・パラプシローシス (*Candida parapsilosis*) を含む複数のカンジダ属菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズし、低次アドレスは、カンジダ・アルビカンズおよびカンジダ・デュブリニエンシスに由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするが、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ビスワナチイまたはカンジダ・パラプシローシスに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズしない。別の好ましい態様において、高次アドレスが汎細菌アドレスである場合、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする汎真菌アドレスが含まれる。きわめて好ましい態様において、本発明のデバイスは汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、および放線菌類アドレスを含む。さらにきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、および腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む。別態様のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、および腸球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む。汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、および腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含むデバイスに、さらに腸球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスが含まれてもよい。さ

らに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、ならびに腸球菌属細菌のリボソーム核酸および腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレスを含む。さらに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、およびブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む。さらに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む。さらに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、ブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレス、およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む。さらに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレス、腸球菌属細菌のリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含み、さらにブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレス、およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含む。さらに別のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、ならびに腸球菌属細菌のリボソーム核酸および腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレス、ならびにブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレスを含む。さらに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレス、腸球菌属細菌のリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレスを含み、さらにブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするアドレス、およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイ

ズするアドレスを含み、さらに単一微生物種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする少なくとも1つのアドレスを含む。きわめて好ましい態様において、単一微生物種は大腸菌、肺炎連鎖球菌、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、カンジダ・アルビカンスおよび黄色ブドウ球菌よりなる群から選択される。さらに他のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、ならびに腸球菌属細菌のリボソーム核酸および腸内細菌科の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレス、ならびにブドウ球菌属細菌に由来するリボソーム核酸およびカンピロバクター属の複数の細菌に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする単一アドレス、ならびに複数の微生物種に由来するリボソーム核酸を個別にハイブリダイズする複数のアドレスを含む。さらに別のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレスおよび放線菌類アドレスを含み、その際、汎細菌アドレスは配列番号：1および配列番号：58よりなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む。さらに別のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレスおよび放線菌類アドレスを含み、その際、汎真菌アドレスは配列番号：4の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む。さらに別のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレスおよび放線菌類アドレスを含み、その際、汎真菌アドレスは配列番号：4の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含む。さらに別のきわめて好ましいデバイスは、汎真菌アドレス、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレスおよび放線菌類アドレスを含み、その際、汎細菌アドレスは配列番号：1および配列番号：58よりなる群から選択される配列を有するポリヌクレオチドプローブを含み、汎真菌アドレスは配列番号：4の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含み、グラム陽性菌アドレスは配列番号：7の配列を有するポリヌクレオチドプローブを含み、放線菌類アドレスは配列番号：10の配列を有するポリヌク

レオチドプローブを含む。さらに別のきわめて好ましい本発明デバイスでは、プローブがそれぞれアクリジニウムエステルで標識されている。

【0012】

本発明の他の態様は、微生物を含有する疑いのある生物試料を分析する方法に関する。この方法は、生物試料を入手する工程から始まる。次いで該試料に含有されるいずれかの微生物の数が増加するのに十分な期間、生物試料を培養する工程がある。次いで、培養した生物試料中のいずれかの微生物からポリヌクレオチドを放出させ、次いで放出されたポリヌクレオチドをプローブマトリックスとハイブリダイズさせる工程がある。本発明方法のある態様によれば、放出されたポリヌクレオチドを *in vitro* ポリヌクレオチド増幅反応において増幅させない。他の態様では、ハイブリダイゼーション工程の前にポリヌクレオチドをたとえば *in vitro* 増幅反応により増幅させる。ポリヌクレオチドプローブマトリックスは複数のアドレスを含み、各アドレスは1以上の微生物種に由来するリボソーム核酸を高ストリンジェント条件下でハイブリダイズする少なくとも1つのプローブを含む。複数のアドレスは、高次アドレス、中次アドレスおよび低次アドレスを含む。低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。本発明方法の工程はさらに、複数のアドレスのそれぞれに対する陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果を検出して、ハイブリダイゼーションプロフィールを確立し；次いで微生物のアイデンティティーを各アドレスにおけるハイブリダイゼーション結果と相関させたルックアップ表と、該ハイブリダイゼーションプロフィールを比較することを伴う。この操作で、生物試料に含有される微生物のアイデンティティーに関する情報が得られる。好ましい態様において、ハイブリダイゼーション反応の塩類濃度は、ハイブリダイゼーション温度が55～65℃の場合は0.6～0.9Mであってよい。選択する高ストリンジェント条件に関係なく、ハイブリダイゼーション工程の高次アドレスは、複数のグラム陽性細菌種、腸内細菌科の複数の細菌種、腸球菌属の複数の細菌種、ブド

ウ球菌属の複数の細菌種、およびカンピロバクター属の複数の細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎細菌アドレスであってよく、ハイブリダイゼーション工程の複数のアドレスは、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレスを含むことができる。この場合、かつ好ましい態様においては、ハイブリダイゼーション工程の中次アドレスは複数のグラム陽性細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレスであってよく、ハイブリダイゼーション工程の低次アドレスは高（G+C）サブセットのグラム陽性細菌に属する複数の細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする放線菌類アドレスであってよい。所望により、入手工程の生物試料は、菌血症、敗血症および真菌血症よりなる群から選択される医学的状态について検査される個体から採取した血液試料であってよく、培養工程は、血液ボトルに該血液試料の一部を接種し、次いで接種した血液ボトルをインキュベートすることを含むことができる。きわめて好ましい態様において、検出工程はルミノメトリーによる検出工程を含む。

【0013】

本発明のさらに他の態様は、リボソーム核酸を含有する試料を分析する方法に関する。この方法は、試料を高ストリンジェント条件下でプローブマトリックスとハイブリダイズさせてハイブリダイズした試料にする工程から始まる。プローブマトリックスは複数のアドレスを含み、これには高次アドレス、中次アドレスおよび低次アドレスが含まれる。低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。本発明方法の他の工程は、ハイブリダイズした試料を分析して、試料中に存在するリボソーム核酸に相補的な少なくとも1つのプローブを含む第1アドレスコレクションを同定し、かつ試料中に存在するリボソーム核酸に相補的な少なくとも1つのプローブを含まない第2アドレスコレクションを同定する。次いで分析工程で同定した第1および第2アドレスコレクションから、どの微生物コレクションが対応するプロフィールのリボソーム核酸配列を有す

るリボソーム核酸を保有するかを判定し、これによりRNA含有試料の微生物源を判定する工程がある。好ましい態様において、ハイブリダイゼーション工程の高次アドレスは、複数のグラム陽性細菌種、腸内細菌科の複数の細菌種、腸球菌属の複数の細菌種、ブドウ球菌属の複数の細菌種、およびカンピロバクター属の複数の細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎細菌アドレスであり、ハイブリダイゼーション工程の複数のアドレスはさらに、複数の真菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする汎真菌アドレスを含む。この場合、ハイブリダイゼーション工程の中次アドレスは複数のグラム陽性細菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするグラム陽性菌アドレスであってよく、ハイブリダイゼーション工程の低次アドレスは高(G+C)サブセットのグラム陽性細菌に属する複数の細菌のリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズする放線菌類アドレスであってよい。本発明方法の分析工程は、ルミノメトリーによる検出を含むことができる。所望により、ハイブリダイゼーション工程を55～65℃で実施する。

【0014】

本発明のさらに別の態様は、プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作で得た結果を分析するのに使用するデバイスに関する。この分析デバイスは、ルックアップ表を記憶させたメモリーデバイスを含む。このルックアップ表は、複数の微生物のアイデンティティーをプローブマトリックス中の複数のアドレスにおける陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果と相関させたものである。複数のアドレスは少なくとも高次アドレス、中次アドレスおよび低次アドレスを含む。低次アドレスは、中次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。中次アドレスは、高次アドレスにおいてハイブリダイズするリボソーム核酸を有する微生物のサブセットに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズする。このデバイスは、メモリーデバイスに接続されたプロセッサーをも含み、このプロセッサーはプロセッサーに入力された結果と該ルックアップ表の比較を行うように設定される。これらの結果は、微生物から放出させたポリヌクレオチドに対する、プローブマトリックス中の複数のアドレスにおける陽性および陰性のハイ

ブリダイゼーションを示すものである。このデバイスはさらに、比較を開始するためにプロセッサに接続されたユーザーインターフェース、および比較の結果を表示するためにプロセッサに接続された出力デバイスを含む。好ましい態様において、メモリーデバイスは磁気記憶媒体を含む。別の好ましい態様において、ユーザーインターフェースは陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果をプロセッサに入力するためのキーボードを含む。さらに他の好ましい態様において、分析デバイスはさらに、陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果をプロセッサに入力するためのインターフェースを介してプロセッサに接続されたプローブハイブリダイゼーション検出器を含む。この場合、検出器はルミノメーターを含むことができる。きわめて好ましい態様において、出力デバイスは視覚表示モニターまたはプリンターである。

【0015】

本発明のさらに他の態様は、細菌試料が黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属菌種を含有するかを判定する方法に関する。この方法は、細菌試料からポリヌクレオチドを放出させて、放出ポリヌクレオチドを採集する工程から始まる。次いで採集した放出ポリヌクレオチドを、ブドウ球菌属細菌のリボソーム核酸に対する特異性を有する第1プローブ、および黄色ブドウ球菌のリボソーム核酸に対する特異性を有する第2プローブとハイブリダイズさせる工程がある。次いで、採集した放出ポリヌクレオチドとハイブリダイズする第1または第2プローブを検出する工程がある。最後に、第1プローブがハイブリダイズし、第2プローブがハイブリダイズしなかった場合には、該細菌試料が黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属菌種を含有すると判定する工程がある。

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、生物試料中の微生物を同定するために使用できる、ポリヌクレオチドに基づく方法、組成物およびデバイスに関する。本明細書に詳述する方法は、ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブの”マトリックス”の使用に依存する。本発明の好ましい態様において、これらのハイブリダイゼーションプローブは、多様な種または分類学上関連のあるグループの生物のリボソーム核酸

(rRNAおよびrDNA)に対して特異的である。この方法を用いると、ハイブリダイゼーション結果を互いに別個に考慮した場合には曖昧な同定が得られるデータコレクションから、微生物の種を判定することができる。事実、プローブマトリックスハイブリダイゼーション法で得た結果を相関性のある一組の結果に属する要素として分析した場合、種および株レベルの同定ですら可能である。以下に記載する方法は、自動微生物同定システムと組み合わせて使用するのに特に適する。

【0017】

緒言と背景

本明細書には、微生物に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブの組合わせを用いる、マトリックスに基づく微生物同定方法を記載する。マトリックス中のプローブは、既知の系統発生関係により互いに区別される微生物を識別する。たとえば、細菌または真菌を識別するrRNA配列の存在または不存在に基づいて微生物を細菌または真菌に分類するように、プローブを選択できる。別の例では、グラム陽性細菌を系統発生的に別個のグラム陰性細菌から識別するために、グラム陽性細菌を同定する1以上のプローブを使用できる。

【0018】

マトリックスに基づく他の態様の微生物同定方法は、リボソーム核酸特異的プローブの組合わせを1回のハイブリダイゼーション反応に使用することに関する。以下にさらに詳細に記載するように、曖昧な結果を与えるプローブの組合わせですら、これらのプローブ組合わせから得たハイブリダイゼーション結果を同一マトリックスから得た他の結果を考慮して解釈すると、種レベルでの同定を提供できる。たとえば、微生物が多数の異なる種のうちの1つである場合、プローブマトリックス中の1つのアドレスが陽性のハイブリダイゼーションシグナルを与えるであろう。より詳細には、マトリックス中のあるアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、細菌分離株がブドウ球菌または大腸菌であると指示できるが、これらの可能性のうちどちらが正しいかは指示しない。しかし、被験生物に由来するrRNAが腸内細菌に特異的なプローブにハイブリダイズ

したという追加所見を考慮に入れると、その微生物は大腸菌にちがいないことが明らかになる。大腸菌のみが腸内細菌として分類され、ブドウ球菌はそうではないからである。”腸内”細菌は腸内細菌科のメンバーであることを理解すべきである。こうして、マトリックスに基づくポリヌクレオチドハイブリダイゼーション操作からの情報を、種同定レベルにまで曖昧にではなく解釈できる。

【0019】

プローブマトリックスハイブリダイゼーションにおける陰性の結果ですら、マトリックスから得られた他の結果と関連づけて考慮すると意味あるものとなりうる。たとえば2座マトリックスから、汎細菌生物を同定する第1アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーションシグナルを与え、汎真菌生物および特定の細菌種の両方を同定する第2アドレスにおいて陰性の結果を与えるポリヌクレオチドを試料が含有すると判定された場合、この組み合わせ結果はそのポリヌクレオチドがマトリックスの第2アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーションシグナルを生じる可能性のある細菌種と異なる細菌種に由来するにちがいないことを示す。この簡単な例は、多重態様のプローブマトリックスがハイブリダイゼーション操作においてごく限られた数の座からの臨床関連情報をいかにして提供できるかを説明する。

【0020】

定義

本明細書中で用いる下記の用語は、別途明記しない限り下記の意味をもつ。

”リボソーム核酸”は、rRNA、およびそのrRNAをコードするrDNAである。

【0021】

”座 (locus)”は、あるものが配置される場である。座は、可溶性ポリヌクレオチドを収容するための、マルチウェル内の1つのウェル；ニトロセルロース膜片もしくはディップスティックに固定化したポリヌクレオチドの単一スポット；または”DNAチップ”上に固定化したポリヌクレオチドの単一スポットであってよい。試験デバイス中の1つの座に配置されたプローブ分子は、デバイス中の他の座に配置されたプローブ分子と混和しない。

【0022】

”アドレス”は、試験デバイス中の1つの座にある1または以上のポリヌクレオチドプローブを表す。これにより、そのアドレスにおけるハイブリダイゼーション結果は、被験ポリヌクレオチドコレクション中に相補的ポリヌクレオチド配列が存在するか存在しないかについての別個の情報を提供する。たとえば、あるアドレスは、細菌由来のrRNAの存在についての情報を提供することができる。そのような情報は、試験デバイス上の単一の座に配置された単一プローブまたはプローブカクテルから得ることができる。あるアドレスは、1またはそれ以上の微生物種、たとえば大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌に由来するrRNAの存在についての情報を提供することもできる。便宜上、特定の生物または特定のタイプの生物の核酸を検出するアドレスを、その生物の名称またはタイプで呼ぶ。従って、”汎細菌アドレス”における陽性のシグナルは細菌由来のリボソーム核酸が存在することを示す。

【0023】

プローブ”マトリックス”は、未知の微生物を同定するために、または未知の生物の、可能性のある同定範囲を狭めるために有用なアドレスのコレクションである。マトリックスのプローブは通常は試験デバイスの複数の物理的座に配置され（可溶性プローブの収容、または物理的固定化による）、ここで各座が1または複数の微生物種に由来する核酸をハイブリダイズする。マトリックスの少なくとも1つの座には、マトリックス中の異なる座に配置された高次プローブによりハイブリダイズする核酸を有する微生物サブグループに由来する核酸をハイブリダイズする低次プローブが配置される。種特異的プローブに対して”高次プローブ”とみなされるプローブの例（系統発生分類の例として）には、分類学上の属、分類学上の科または分類学上の目に対する特異性をもつプローブが含まれる。

【0024】

”低次アドレス”および”高次アドレス”という用語は、互いに機能的に定義される。低次アドレスは、高次アドレスにおいて検出されるリボソーム核酸を有する生物サブセットに由来するリボソーム核酸を検出する。たとえば、単一種の細菌を検出するアドレスは、汎細菌生物を検出する他のアドレスに対して”低次

アドレス”とみなされる。

【0025】

”中次アドレス”は、機能的に、対応する高次アドレスにおいて検出されるリボソーム核酸を有する生物サブセットに由来するリボソーム核酸を検出するアドレスと定義される。中次アドレスは、対応する低次アドレスにおいて検出される生物サブセットより多数またはより広い範囲のリボソーム核酸を検出する。たとえば汎細菌生物および大腸菌細菌種を独立して検出する2つのアドレスに対して、腸内細菌科の細菌を検出するためのアドレスは中次アドレスであろう。その理由は、腸内細菌科アドレスは汎細菌アドレスにおいて検出できるリボソーム核酸を有する生物サブセットに由来するリボソーム核酸を検出し、腸内細菌科アドレスにおいて検出される細菌生物の範囲は大腸菌を他の細菌種のほかに含むからである。

【0026】

”プローブ”は、相補的一本鎖標的ポリヌクレオチドと結合して二本鎖ハイブリッドを形成する一本鎖ポリヌクレオチドである。プローブはオリゴヌクレオチドまたはヌクレオチドポリマーであってよく、検出可能部分を含むことができ、この部分はプローブ末端（両端）に結合していてもよく、あるいはプローブ内部にあってもよい。標的ポリヌクレオチドと結合するヌクレオチドは、検出可能部分がプローブ配列に対して内部にある場合のように、厳密に連続的である必要はない。

【0027】

”検出可能部分”は、ポリヌクレオチドプローブに結合した、またはその一部として合成された分子である。この分子は特異的に検出されなければならない、その結果そのプローブも検出されるであろう。これらの検出可能部分は、しばしば放射性同位体、化学発光分子、酵素、ハプテン、レドックス活性電子伝達性部分、たとえば遷移金属錯体、金属標識、たとえば銀粒子もしくは金粒子であり、あるいはユニークオリゴヌクレオチド配列であってもよい。

【0028】

”ハイブリッド”は、相補的塩基間のワトソン-クリック塩基対合または非規

定 (non-canonical) 塩基対合により2つの一本鎖ポリヌクレオチド間に形成された複合体である。

【0029】

”ハイブリダイゼーション”は、2つのポリヌクレオチド相補鎖が結合して二本鎖構造体(”ハイブリッド”)を形成するプロセスである。

”相補性”は、各鎖上のワトソン-クリック塩基対間の水素結合によりハイブリッドまたは二本鎖DNA:DNA、RNA:RNA、またはDNA:RNAを形成しうる一本鎖DNAまたはRNAの塩基配列により得られる特性である。アデニン(A)は通常はチミン(T)またはウラシル(U)と相補し、一方グアニン(G)は通常はシトシン(C)と相補する。

【0030】

”ミスマッチ”とは、ハイブリッドにおいて規定(canonical)ワトソン-クリック水素結合を形成しない2つのヌクレオチドの対合を表す。さらに以下の考察のために、ミスマッチには、ハイブリッドの一方の鎖において非対合ヌクレオチド(1以上)を生じるような挿入または欠失を含めることができる。

【0031】

”ストリンジェント”という用語は、ハイブリダイゼーションおよびその後の処理工程に際して存在する温度および溶媒組成物を記述するために用いられる。高ストリンジェント条件下では、相補性の高い核酸のハイブリッドのみが形成され、十分な相補度をもたないハイブリッドは形成されないであろう。したがって、アッセイ条件のストリンジェントは、ハイブリッドを形成する2つのポリヌクレオチド間に必要な相補性の程度を決定する。ストリンジェント条件は、標的ポリヌクレオチドおよび非標的ポリヌクレオチドと形成されるハイブリッド間の安定性の差が最大になるように選ばれる。

【0032】

”プローブ特異性”という用語は、標的配列と非標的配列を識別する能力を記述するプローブ特性を表す。プローブ特異性は、配列およびアッセイ条件に依存し、絶対的であってもよく(すなわちプローブが標的生物と非標的生物を識別することができる)、あるいは機能的であってもよい(すなわちプローブが標的生

物とその試料中に普通に存在する他のいずれの生物をも識別することができる)。使用条件に応じて、広いまたは狭い特異性決定のために多数のプローブ配列を使用できる。

【0033】

”ポリヌクレオチド”とは、RNAもしくはDNA、および合成ヌクレオチド類似体、または他の分子であって、配列中に存在してもよく、かつそのポリヌクレオチドと相補配列をもつ第2分子とのハイブリダイゼーションを阻害しない分子を意味する。この用語には、天然に出現するヌクレオチドの類似体を含むポリマーが含まれ、特にプローブの2'位にメトキシ基(OMe)をもつ類似体が含まれる。本明細書中で用いるメトキシポリヌクレオチド、または”T”残基を含むオリゴヌクレオチドは、リボース部分の2'位にメトキシ基、およびヌクレオチドの塩基の位置にウラシルをもつ。”OMe T”と具体的に明記した場合、それはヌクレオチドの塩基部分がチミン残基で占められていることを意味する。

【0034】

”オリゴヌクレオチド”は、長さ10~100ヌクレオチド、より好ましくは10~50ヌクレオチドをもつポリヌクレオチド分子である。通常は、オリゴヌクレオチドは有機化学的方法で合成され、別途明記しない限り一本鎖である。オリゴヌクレオチドを検出可能な標識で標識することができる。

【0035】

”ヘルパーオリゴヌクレオチド”は、アッセイプローブが結合する領域以外の標的ポリヌクレオチド領域を結合するオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドの標的化領域に新たな二次元または三次元構造を与え、これによりアッセイプローブの結合速度が促進される。ヘルパーオリゴヌクレオチドは検出可能な標識で標識されていないが、標識プローブの結合を容易にし、したがって間接的にハイブリダイゼーションシグナルを増強する。

【0036】

”微生物(microorganismまたはmicrobe)”は、細菌、真菌または原生動物である。

”汎細菌生物”は、他のいずれかの細胞タイプではなく細菌として分類される微生物である。すべての真正細菌が汎細菌生物として分類されるであろう（古細菌は必ずしもそうではない）。酵母または他の真菌もしくは真核生物は汎細菌生物に分類されない。

【0037】

”汎真菌生物”は、他のいずれかの細胞タイプではなく真菌として分類される微生物である。すべての酵母が必然的に汎真菌生物として分類されるであろう。もちろん真正細菌および古細菌（これらは分類学上、異なる上位界（super kingdom）のメンバーである）は汎真菌生物としては分類できない。

【0038】

”生物試料”は、微生物の存在について検査すべき材料の試料を表す。生物試料は、生物、たとえばヒト患者、実験動物、たとえばマウス、ラット、ブタ、サルまたは他の科の霊長類から、血液試料、喀痰試料、髄液試料または尿試料を採取することにより得られる。通常は生物試料はハイブリダイゼーション可能なポリヌクレオチドを含有するであろう。これらのポリヌクレオチドを、生物試料を構成する生物から放出させてもよく、あるいは試料中の生物から細胞の超音波破壊または酵素分解もしくは化学分解などの方法で放出させてもよく、これによりポリヌクレオチドをポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションに利用できる。

【0039】

”確定結果（confirming result）”は、あるプローブマトリックスの1つのアドレスにおいて得た結果であって、同一プローブマトリックス中の異なるアドレスにおいて得た異なる結果を解釈するのに必要な情報を提供するものである。たとえば第1結果が、ある微生物はグラム陽性細菌または真菌であることを指示した場合、その生物が汎細菌アドレスにおいてハイブリダイズするrRNAをも含有することを示す結果は、その生物がグラム陽性細菌であったことを示す確定結果となるであろう。

【0040】

”ルックアップ表”は、プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作に

おける陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果の可能な組合わせを示すデータコレクションを、そのコレクションの各データエントリーの関連解釈と共に示したものである。ルックアップ表は、コンピューター可読媒体に記憶させることができる。

【0041】

マトリックスに基づく微生物検出および同定方法の有用性

マトリックスに基づく微生物同定方法は、臨床試験室検査、食品検査および環境検査に幅広く役立つ。本発明は培養微生物の同定に使用できるが、微生物のアイデンティティを判定するために微生物を特殊な培地で増殖させる必要はない。この系は、微生物感染症の迅速臨床診断に特に有用であり、これには口腔、血流（敗血症および真菌血症）、生殖器および生殖器周囲組織、尿路、消化管、外傷および外科創傷、心臓組織（感染性心内膜炎）、眼、聴覚器官、ならびに脳脊髄液の感染症が含まれる。この系は、免疫無防備状態の個体、たとえばHIV感染個体、または骨髄移植に用いる免疫抑制剤で処置された個体において、その個体が感染症の症状を示していなくても、潜在的有害微生物の存在を監視するのにも有用である。同様に、本発明方法は家畜の獣医学的診断に際して感染症（たとえばウシの乳腺炎）を検出するのに有用である。

【0042】

本発明は、環境試料中の1またはそれ以上のタイプの微生物の存在を検出するのに利用できる。たとえば本発明は、市の水処理効果またはレクリエーション水源の汚染物質レベルの監視に利用できる。環境試料を本発明方法に従って検査することにより、水系または非水系中の有害微生物を検出できる。本発明のこの態様において特に関心のある微生物は、腐食、バイオマス蓄積の原因となるか、あるいはパイプライン、貯蔵タンクまたは加工施設の破壊プロセスに関与する。製造プロセス、たとえば紙、繊維および電子部品の製造に有益または有害な影響を与える微生物に関する環境水試料の検査も、本発明方法により実施できる。本発明は、食品または農業試料中の微生物の検査にも利用できる。本発明のこの態様において特に関心のある微生物は、疾病の予防のために、または環境汚染の指標として利用できる。試料を有害微生物（すなわち汚染体）に関して監視するほか

、本発明は有益微生物、たとえば天然発酵食品および飲料中に存在する微生物の検出、同定および定量にも利用できる。

【0043】

さらに、以下に詳述する方法は、新規な抗微生物療法薬を見出すのに利用できる。より具体的には、本発明のマトリックスに基づく微生物同定方法は、候補抗微生物薬が *in vitro* または *in vivo* で微生物の増殖を阻害または抑制するかということを迅速監視するのに利用できる。さらに本発明方法は、抗生物質に対する生物（混合培養において、または精製分離培養として）の感受性を監視するために利用できる。

【0044】

最小プローブマトリックス

本発明方法によれば、ポリヌクレオチドを含有する生物試料をポリヌクレオチドプローブのコレクションにハイブリダイズさせる。これらのプローブはそれぞれ少なくとも1種類の微生物のリボソーム核酸に対する結合特異性をもつ。プローブのコレクションは、核酸を含有する試料中における1またはそれ以上のポリヌクレオチド配列の存在または不存在に関する情報を提供する一連の”アドレス”として組織化されている。重要な点であるが、リボソーム核酸配列の *in vitro* 増幅は、本明細書の開示する方法の成功にとって不必要である。事実、*rRNA* または *rDNA* 配列の *in vitro* 増幅をハイブリダイゼーション工程前に行ってもよいが、生物試料から放出されたポリヌクレオチドを前増幅工程なしにポリヌクレオチドプローブのコレクションにハイブリダイズさせることが好ましい。ハイブリダイゼーション操作後、各アドレスを分析して、陽性または陰性のいずれの結果が得られたかを評価する。

【0045】

最小プローブマトリックスには2つの座が含まれ、第1座に単一プローブが配置され、第2座に複数のプローブが配置される。プローブマトリックスの第1アドレスの一例は、すべての細菌生物に由来する *rRNA* を検出するために使用できる。第2アドレスの一例は、すべての真菌生物およびグラム陽性細菌に由来する *rRNA* を検出するために使用できる。これは下記により達成できる。96ウ

エルマイクロタイタープレート第1ウェルに、すべての細菌種間に保存されている rRNA セグメントをハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブを配置する。第2ウェルには、任意の真菌生物に保存されている rRNA セグメントをハイブリダイズするプローブ、およびグラム陽性細菌の rRNA をハイブリダイズするがグラム陰性細菌の rRNA はハイブリダイズしないプローブの組合わせを収容する。この2座マトリックスを、十分に分離された微生物の単一コロニーから単離したポリヌクレオチドとハイブリダイズさせると、3つの疑問に対する回答が得られるであろう。より具体的には、例示した2座マトリックスは、その生物の由来が細菌であったか；細菌生物がグラム陽性細菌またはグラム陰性細菌のいずれであったか；およびその微生物が真菌であったか（これは互いに単一微生物系についての細菌同定を排除する）を指示することができるであろう。

【0046】

わずか2つの座から得た結果を分析することによりこれら3つの疑問に曖昧でない回答を得ることができるという事実は、マトリックス法を利用すればごく簡単な試験デバイスからの出力データの価値をいかに最大限に利用できるかを具体的に説明する。2つの座はそれぞれ2つの結果のうちの1つ、すなわち陽性または陰性を生じるので、可能性のある結論の数は、各座において可能性のある結果の数(2)にマトリックス中の座の数(2)を乗じたものであろう。たとえば2座マトリックスについては、可能性のある結論の数は 2^2 、すなわち4であろう。これらの結果の解釈は表1を参照すれば理解できる。表1には、陽性のハイブリダイゼーション結果を“(+)”、陰性のハイブリダイゼーション結果を“(−)”で示す。

【0047】

【表1】

表 1

2座マトリックス例で得た結果の解釈

	(汎真菌／グラム陽性菌) (-)	(汎真菌／グラム陽性菌)(+)
汎細菌 (-)	(-/-):細菌または真菌の不存在	(-/+): 真菌生物
汎細菌 (+)	(+/-): グラム陰性細菌	(+/+): グラム陽性細菌

【0048】

表1の情報は、被験生物のタイプを同定するためにハイブリダイゼーション結果のプロフィールを復号するのに利用できる”ルックアップ”表の1形態を示す。上記の例においてグラム陽性プローブの代わりに大腸菌に対する種特異的プローブを用いると、この改変2座マトリックスはその生物が細菌または真菌のいずれであるか、およびいずれか検出された細菌が大腸菌であるかを判定するのに有用であろう。

【0049】

プローブマトリックスハイブリダイゼーション手法で得た結果を、キーボードを用いて手動で、または自動デバイス、たとえばプレートリーダー、フィルムスキャナーもしくはルミノメーターからインターフェースを介して直接に、コンピューターまたはデータプロセッサー(”コンピューター”)に入力することができる。コンピューターは特定の生物についての陽性または陰性のハイブリダイゼーション結果をソーティングして、プロフィールを確立することができる。次いで、操作を実施するのに用いた生物のアイデンティティー、または結果が曖昧である場合には1より多くの生物に特徴的なアイデンティティー候補を判定するために、このプロフィールをコンピューターに接続したメモリーデバイスに記憶させたルックアップ表と比較して、このハイブリダイゼーションプロフィールと対照生物を用いて得たハイブリダイゼーション結果とを関連づけることができる。

【0050】

たとえばインターフェースを介してルミノメーターに接続したコンピューターに、表1に示した可能性のある4つの結論についてのルックアップ表をメモリーデバイスに記憶させておくことができる。(+/+)ハイブリダイゼーション結

果を表す入力を受信に応答して、コンピューターが用いるアルゴリズムがこの結果とルックアップ表を比較し、被験生物がグラム陽性細菌であったことを指示する出力を与える。入力（－／－）、（＋／－）および（－／＋）についての別の結果は、それぞれ細菌性または真菌性のハイブリダイゼーションポリヌクレオチド種の不存在、グラム陽性細菌以外の細菌の存在、および真菌生物の存在を指示する出力を催促するであろう。2より多い座をもつ、より複雑なマトリックスについての同様な復号プロセスも、同じ操作で実施できる。より複雑なマトリックスは、より完全な生物同定を提供するであろう。

【0051】

プローブマトリックスに基づく方法の別の例では、特定の微生物種を検出するための第3座を前記の2つの座に加えることができる。より具体的には、第1座は汎細菌 rRNA 配列の存在についての情報を提供し；第2座は汎真菌プローブおよびグラム陽性細菌に対するプローブのハイブリダイゼーションについての情報を提供し；第3座は特定の細菌種および真菌種についての情報を提供することができる。具体的な第3座は、大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌に由来する rRNA の存在についての情報を提供することができる。この3座マトリックスを用いたハイブリダイゼーション結果の予想結論を表2に示す。3つの座はそれぞれ2つの結果のうちの1つを提供するので、この表のエントリー数は 2^3 、すなわち8により与えられる。この場合も、次表に示す結果は単一タイプの生物の純粋培養を想定する。

【0052】

【表2】

表 2

3座マトリックス例で得た結果の解釈

汎細菌／汎真菌と グラム陽性／種プローブ	解釈
(-/-/-)	細菌または真菌が検出されない
(+/-/-)	グラム陽性菌を検出
(+/+/-)	グラム陽性菌を検出；黄色ブドウ球菌 または肺炎連鎖球菌は検出されない
(+/+/+)	検出したグラム陽性菌は黄色ブドウ球菌 または肺炎連鎖球菌
(-/-/+)	結果は意味をもたない
(-/+/-)	カンジダ・アルビカンズ以外の真菌を検出
(-/+/+)	カンジダ・アルビカンズを検出
(+/-/+)	細菌を大腸菌または緑膿菌として検出

【0053】

表2に示した情報は、例示した3座マトリックスについて得たあらゆる結果を解釈するのに使用できるルックアップ表である。この場合も、3座マトリックスを用いて得た結果が、わずか1つの座の違いがあるマトリックスと比較してより広範囲の同定情報を提供するのに十分であることは明らかであろう。上記の例では、3座マトリックスは：（1）ある生物を細菌または真菌のいずれかに分類する；（2）細菌をグラム陽性菌またはグラム陰性菌と同定する；（3）真菌種がカンジダ・アルビカンズであるかを判定する；（4）グラム陰性細菌が大腸菌または緑膿菌であるか否かを指示する；（5）グラム陽性細菌が黄色ブドウ球菌または肺炎連鎖球菌のいずれかであることを指示する；（6）グラム陽性細菌ではない細菌培養物が大腸菌または緑膿菌のいずれかであることを指示する、ために十分であった。

【0054】

重要な点であるが、表2に示した結果は、曖昧なエントリーがルックアップ表にあるのを許容できることを示す。これらの結果は、感染症の診断に際してなお

意味をもちうるからである。たとえばこの表の” (+/+/-) ” の結果は、その生物が黄色ブドウ球菌または肺炎連鎖球菌以外のグラム陽性細菌であることを指示した。このように、診断から特定の生物を排除するために曖昧な同定スキームを用いるのが許容される。同様に、ある生物を多数の異なる種のうちの1つであると同定することも許容され、これも適切な抗生療法の判断に利用できる、臨床意味のある結果を達成する。これを表2に” (+/-/+) ” の結果で示す。これは細菌生物が2つの候補のうちの1つであることを指示した。

【0055】

さらに、表2の結果は、意味のないエントリーがルックアップ表にあるのを許容できることを示す。この例では、” (-/-/+) ” の結果は意味がなかった。最初の2つの座のうちの少なくとも1つにおいて同様に陽性のハイブリダイゼーション結果をもつことなく、第3座において陽性のハイブリダイゼーション結果を達成するのは不可能だからである。このように意味のないプローブマトリックスハイブリダイゼーション結果があるのは許容できる。ただし、真正細菌と交差反応しない古細菌プローブを第3アドレスの種特異的プローブのコレクション中に配置すると、” (-/-/+) ” の結果に意味が与えられるであろう。

【0056】

明らかに、2つという少ないアドレスをもつプローブマトリックスが被験生物のアイデンティティーについて有用な情報を提供できる。たとえば第1アドレスが細菌生物を検出し、第2アドレスが真菌生物を検出する場合、この2アドレスマトリックスはある生物が細菌または真菌のいずれであったかを判定するのに有用であろう。このマトリックスに第3アドレスを加えると、さらに情報が得られ、マトリックスの有用性が拡大するであろう。第3アドレスの一例は、たとえばグラム陽性細菌の rRNA を検出することにより、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の rRNA を識別する。したがって、汎細菌プローブおよびグラム陽性プローブについて陽性のハイブリダイゼーション結果を指示し、汎真菌ハイブリダイゼーションプローブについては陰性の結果を指示した3アドレスマトリックスは、グラム陽性細菌の存在および真菌の不存在を指示するであろう。第4アドレスをこのマトリックスに加えると、さらに大きな機能性が得られる。第4アドレス

の一例は、放線菌類サブセットのグラム陽性細菌に属する細菌を検出する。マトリックスへの第5アドレスの追加は、腸内細菌の生物または腸球菌属のメンバーを同定するのに使用できる。これは、これら2タイプの細菌が存在したとき陽性のハイブリダイゼーションシグナルを与える複数のrRNA特異性プローブを用いて達成できる。明らかに、本発明の別個の好ましい態様においては、腸球菌または腸内細菌のrRNAに対する特異性をもつプローブを、試験デバイスの異なる座および共通の1つの座に配置する。ブドウ球菌属およびカンピロバクターグループの細菌を同定するために第6アドレスを使用できる。また本発明の別個の好ましい態様においては、ブドウ球菌属およびカンピロバクターグループの細菌のrRNAに対する特異性をもつプローブを、試験デバイスの異なる座および共通の1つの座に配置する。種特異的プローブのコレクションを示す第7アドレスは、特定の種を確実に同定するのに適切な情報を提供できる。たとえば、第7アドレスは大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌に対する種特異的プローブを含むことができる。これらの種はきわめて異なる生物であるが、第7アドレスの種特異的プローブについて陽性のハイブリダイゼーション結果をこのマトリックスにおける他のすべての結果と組み合わせ、またはそれらと関連づけて解釈しなければならないことは明らかであろう。第7アドレスにおいてみられた陰性のハイブリダイゼーション結果についても同じことが言える。以上のマトリックスの例は、本発明の好ましい態様である。以上の例ではrRNA特異性プローブについて具体的に述べたが、もちろんプローブはrRNAまたはrDNAに対する結合特異性をもつことができると理解すべきである。

【0057】

マトリックスに基づく生物同定方法

マトリックスに基づくハイブリダイゼーション方法の重要な特色は、マトリックスを構成する要素的地址間に関係に関連する。好ましいプローブマトリックスは、“高次”アドレスと“低次”アドレスの組合わせを含む。高次アドレスは常に1より多い生物種の同定に用いられ、同じマトリックスの他の少なくとも1つのアドレスにおいて同定される生物を完全に包含する。つまり、放線菌類サ

ブセットのグラム陽性細菌を同定するアドレスは、より広範囲のカテゴリーのグラム陽性細菌に特異的なアドレスに対して低次アドレスとみなされる。同じ関係が、グラム陽性細菌を同定するのに有用なアドレスと汎細菌生物を同定するのに有用なアドレスの特性である。有利には、特定の rRNA または rDNA 種がプローブマトリックス中の 1 より多いアドレスにおいてハイブリダイズする能力に固有の冗長性 (redundancy) は、陽性と陰性の両方のハイブリダイゼーション結果が有益であることを意味する。3つのアドレスを含むプローブマトリックスは、高次アドレスおよび低次アドレスのほかに中次アドレスを含むことができる。

【0058】

高次アドレス、中次アドレスおよび低次アドレスは、分子分類学のヒエラルキーにより関連づけられる。高次アドレスは広範囲のカテゴリーの微生物細胞タイプを同定する。たとえば高次アドレスは汎細菌生物の同定に使用できる。中次アドレスは、グラム陽性細菌のサブセットを同定できる。次いで低次アドレスは放線菌類サブセットのグラム陽性細菌を同定できる。さらに、低次アドレスは放線菌類のメンバーである特定の種、たとえば肺炎連鎖球菌を同定できる。

【0059】

プローブマトリックスに基づくハイブリダイゼーション操作から得た結果は、標的核酸が予め選択したアドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーションを示すか否かを指示する。特定のアドレスにあるポリヌクレオチド (1以上) は陽性のハイブリダイゼーションを示す標的配列とのミスマッチを含んでいてもよいので、陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、必ずしもそのプローブの相補配列が標的核酸配列中にみられることを示すわけではないことを理解すべきである。これは、微生物コレクション、たとえば汎細菌生物またはある細菌属を同定するために単一ハイブリダイゼーションプローブを用いる場合についても言える。ただし、ある場合には陽性のハイブリダイゼーション結果がプローブの配列と標的ポリヌクレオチド中にみられる相補配列との厳密な対応を示すことも理解すべきである。これは、種特異的プローブを用いる場合に当てはまることが多い。そのような場合、特に単一タイプの標的核酸にのみハイブリダイズするプローブを用

いることが望ましい。

【0060】

プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作から得た結果は、同じ操作から得た他の結果と関連づけて解釈すると、最も有益である。高次アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、被験生物がそのアドレスにおいて同定された生物グループのメンバーであることを指示する。たとえば汎細菌生物を同定するアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、その被験生物が細菌であることを指示するが、その生物のアイデンティティーに関してそれ以上の情報を提供しない。中次アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、その被験生物が高次アドレスにおいて同定された生物サブセットのメンバーであり、かつ中次アドレスにおいて同定された生物コレクションのメンバーであることも指示する。もちろん、高次アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果および中次アドレスにおける陰性のハイブリダイゼーション結果は、その被験生物が中次アドレスにおいて同定された生物グループに含まれないことを意味する。たとえば汎細菌およびグラム陽性菌アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、その生物がグラム陽性サブセットの細菌であったことを指示する。陰性のハイブリダイゼーション結果は、その生物が陽性のハイブリダイゼーション結果を与えるであろう生物とは異なるにちがいないということを指示する。たとえばグラム陽性細菌を検出するアドレスにおける陰性のハイブリダイゼーション結果は、その被験生物がグラム陽性細菌ではなかったことを指示する。最後に、低次アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、その生物がその低次アドレスにより同定された生物グループのメンバーであることを指示する。低次アドレスが特定の種に対応する場合、この陽性の結果は被験生物の種を同定する。

【0061】

もちろん、プローブマトリックス中のアドレス間の高次／中次／低次関係が相対的なものであることは、当業者に自明であろう。グラム陽性菌アドレスは放線菌類アドレスに対しては高次であり（放線菌類はグラム陽性生物の1サブセットだからである）、グラム陽性菌アドレスは汎細菌生物を同定するアドレスに対し

ては低次である（グラム陽性生物は汎細菌生物の1サブセットだからである）。しかし、汎細菌アドレス、グラム陽性菌アドレスおよび放線菌類アドレスを含む3アドレスプローブマトリックスに関しては、グラム陽性菌アドレスはそのマトリックス中の他のアドレスとの関係で中次アドレスとみなされる。

【0062】

プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作からの陽性と陰性の結果の総合コレクションを解釈して、生物試料中に存在する生物のアイデンティティーについての情報を得ることができる。重要なことは、陰性の結果がプローブマトリックスに関して報知性が高いことである。多くの場合、生物の種レベルのアイデンティティーを判定できるであろう。しかし、有用な情報を得るためには必ずしも種レベルの同定を達成する必要はない。生物の広範な分類学上の特性の判定のみ、または候補生物のコレクションから1またはそれ以上の種を排除することですら、臨床状況において有益となる可能性がある。

【0063】

事実、感染に関与する生物が細菌または真菌のいずれであるかを判定するのはきわめて有益であろう。この基礎的情報は、ある感染症の処置に抗菌薬または抗真菌薬のいずれを使用すべきかを判断するために有用である。あるいは、細菌感染症がグラム陽性またはグラム陰性のいずれの生物により起きたかを確認することは有用であろう。これら2タイプの細菌により起きる感染症は、一般に異なる抗生物方式で処置され、異なる臨床予後をもつからである。マトリックスに基づく微生物同定方法の他の利点は、結果入手の迅速性に関係する。

【0064】

臨床試験室業務では、原因生物を同定しなければならない感染症を伴う患者から生物試料を得る必要のある場合が多い。生物試料はスワブ（s w a b）または体液試料の形であってよい。たとえば患者が呼吸器系感染症に罹患している場合は喀痰試料、または菌血症もしくは敗血症の疑いがある場合は血液試料であってよい。次いでこの生物試料を、生物の増殖の結果として生物数が増加する期間、培養することができる。次いで代謝試験または生化学的検査を行って、培養生物に関する情報をさらに得ることができる。

【0065】

マトリックスに基づく微生物同定方法は、従来法と幾つかの点で異なる。マトリックスハイブリダイゼーションは、一連の独立した検査として実施するのではなく、同時にかつ好ましくは同じプラットフォームで実施されるので、第2検査の選択および開始前に第1検査の結果を得る必要がない。前記のように、陰性の結果に意味がある。それらを陽性のハイブリダイゼーション結果のバックグラウンドと対比して解釈するからである。

【0066】

重要な点であるが、本明細書に記載するプローブマトリックス法は、他の場合には曖昧な同定が得られるにすぎないデータコレクションから生物のアイデンティティーを解明できる。場合により、プローブマトリックス中のアドレスは、生物試料が幾つかの異なるポリヌクレオチドプローブの1つをハイブリダイズするrRNAを含有するかを指示することができる。たとえば、プローブマトリックスの単一アドレスが、大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌に対する種特異的プローブを含むことができる。このアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、これら5種の微生物のうち1またはそれ以上の存在を曖昧に指示する。しかし、マトリックス中の他のアドレスからの確定結果を考慮すると、ハイブリダイズしたrRNAの由来を解明できる。たとえば汎細菌プローブに対応するアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果、および汎真菌プローブに対応するアドレスにおける陰性のハイブリダイゼーション結果を考慮すると、汎真菌プローブは陰性のハイブリダイゼーションシグナルを与えたのであるから、その由来が酵母カンジダ・アルビカンズではあり得ないことが明らかである。さらにグラム陽性細菌に対するアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルを考慮すると、その微生物は大腸菌または緑膿菌ではあり得ないことが明らかである。これらの微生物はグラム陰性細菌だからである。したがって、被験試料は黄色ブドウ球菌または肺炎連鎖球菌にちがいない。最後に、これらの総合結果をさらにブドウ球菌属またはカンピロバクターグループの細菌に対応するアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果を考慮すると、この生物試料に含有されていた生物は黄色ブド

ウ球菌にちがいないことが明らかである。肺炎連鎖球菌はブドウ球菌属またはカンピロバクター属の生物ではないからである。こうして、さもないと曖昧な結果のコレクションを提示された場合に、生物のアイデンティティーについて曖昧でない結論に到達することができる。

【0067】

生物の存在の指標としてのリボソーム核酸

一般に、生物試料が微生物に特徴的な rRNA または rDNA を含有する場合、その生物試料中に微生物の存在が指示されるというのは真実である。つまり、生物試料中に特定の rRNA が存在すると、その rRNA を産生する微生物の存在が診断される。グラム陽性細菌に特異的なプローブとのハイブリダイゼーション反応により陽性の結果が得られると、その結果はその生物試料中に 1 種またはそれ以上のグラム陽性細菌が存在することを指示する。これに対し、陰性の結果は、グラム陽性細菌が存在しないことを指示する。もちろん、検査結果の有効性を確実にするために、陽性および陰性の対照ハイブリダイゼーションを並行して実施することができる。

【0068】

微生物の検出および同定に関する分子系統発生関係

マトリックスに基づく微生物同定方法は、好ましくは既知の分子系統発生関係に従って生物のリボソーム核酸を識別するアドレスに対応するポリヌクレオチドを使用する。これらの識別を行うのに有用なプローブを、本明細書において” 分類学的識別体 (taxonomic differentiator)” と呼ぶ。本発明の目的は、異なる種およびグループの微生物に由来するリボソーム核酸を識別する分子系統発生分岐点を区別するのに最適なポリヌクレオチドプローブの組を使用することである。

【0069】

分子分類学のヒエラルキーにより関連するアドレスを用いてプローブマトリックスを構築すると、最小数のハイブリダイゼーションプローブのみに基づいて、微生物の特徴を臨床的に適切な程度に分類することが可能になる。この場合も、本発明のこの特色が可能であるのは、プローブマトリックスハイブリダイゼーシ

ョン方法に関しては陽性と陰性の両方のハイブリダイゼーション結果が意味をもつからである。

【0070】

”分子分類学のヒエラルキー (hierarchy of molecular taxonomy)” という句は、本明細書において関連核酸配列により検出できる界、門、綱、目、科、属、亜属、種および株レベルでの生物間の関係を表すために用いられる。たとえば個々の細菌種は、ユニークドメイン（その種に特徴的）および細菌属に一般的な共通ドメインを含むリボソーム核酸配列をもつであろう。アドレス間のこのヒエラルキー関係が、プローブマトリックスに基づく微生物同定方法の広範な有用性に寄与する。

【0071】

好ましいプローブマトリックスは、少なくとも1つの高次アドレスおよび少なくとも1つの低次アドレスをもつ。他の好ましいプローブマトリックスは、さらに少なくとも1つの中次アドレスを含む。さらに他の好ましいプローブマトリックスは、さらに少なくとも1つの中次アドレスと、高次アドレスにおいて同定できる生物を包含する上位界と異なる分類学上の上位界に属する生物に特異的な少なくとも1つのアドレスの両方を含む。たとえば特定のプローブマトリックスの高次アドレスが汎細菌生物（上位界原核生物 (Procar yotae) のメンバーである）を同定する場合、分類学上の異なる上位界の生物に特異的なアドレスの例は、上位界真核生物 (Eucaryotae) （真菌界、原生生物界、動物界および植物界を含む）の生物に対するアドレスであろう。プローブマトリックスの高次、中次および低次アドレスが細菌生物を同定する場合、特定の好ましいマトリックス中の第4アドレスは真菌生物を同定する。

【0072】

本発明方法に従って多数の3アドレスプローブマトリックスを作製し、使用することができる。表3に、種々の3アドレスプローブマトリックスに使用できる若干のアドレスの機能を記載する。

【0073】

【表3】

表 3
3座マトリックス例の機能の説明

高次アドレス	中次アドレス	低次アドレス
生物のコレクション を同定	高次アドレスにおいて同定 できる生物サブセット を同定	中次アドレスにおいて同定 できる生物サブセット を同定
科	属	亜属
属	亜属	種
汎細菌	細菌科	細菌種

【0074】

表3には、3アドレスマトリックスのコレクションにおける高次、中次および低次アドレス間の機能関係を示す。一般に低次アドレスは中次アドレスにおいて同定できる生物サブセットを同定し、中次アドレスはプローブマトリックスの高次アドレスにおいて同定できる生物サブセットを同定する。この関係は下記のアドレスをもつプローブマトリックスの特色である：（1）汎細菌生物、（2）ブドウ球菌属に属する生物、および（3）黄色ブドウ球菌種。別の例では、高次アドレスはある分類学上の科に属する生物を同定でき、中次アドレスはある分類学上の属に属する生物を同定でき、低次アドレスはある分類学上の亜属に属する生物を同定できる。属、亜属、および特定の細菌種に属する生物を同定するアドレスについても、同じパターンの関係がある。もちろん、高次アドレスは特定の界の生物、たとえばすべての細菌を包含する原核生物界を同定することもできる。事実、汎細菌アドレスを含むプローブマトリックスが本発明にきわめて好ましい。

【0075】

分類学的指標の具体例

汎細菌アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーション結果を与える生物には、マトリックス中のグラム陽性菌アドレス、放線菌類アドレス、腸内細菌科の細菌を検出するアドレス、ブドウ球菌属の細菌を検出するアドレス、カンピロバクター属菌種を検出するアドレス、または細菌種アドレスにおいてハイブリダイズするすべての細菌が含まれる。汎細菌アドレスは、真菌生物のリボソーム核酸をハイブリダイズしない。

【0076】

汎真菌アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーション結果を与える生物には、カンジダ・アルビカンスおよび他の真菌種が含まれるが、細菌生物は含まれない。

【0077】

グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の区別は、2方法のいずれかにおいて行うことができる。第1に、グラム陽性細菌に特異的なアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、生物がグラム陽性細菌であり、グラム陰性細菌ではないことを指示できる。第2に、グラム陰性細菌に特異的なアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、生物がグラム陰性細菌であり、グラム陽性細菌ではないことを指示できる。本明細書の実施例に示すように、この区別を行うためにはグラム陽性細菌に特異的なアドレスを用いるのが好都合であった。グラム陽性菌アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーション結果を与える生物には、放線菌類、ブドウ球菌属に分類される細菌、腸球菌属に分類される細菌が含まれるが、腸内細菌科に属する細菌は含まれない。

【0078】

放線菌類、すなわち”高(G+C)”サブセットのグラム陽性細菌は、真正細菌に属する別個の進化系統である。放線菌類は、特徴的に高い変異率を反映して、きわめて異例な表現型特色を示す。このグループの多数のメンバーが抗生物質を産生し、一般に土壤中にみられる。放線菌類の細菌は結核、らい病、ジフテリアおよび歯周疾患を含めた重大な動物疾患に関与する。コリネバクテリウム属(*Corynebacterium*)およびマイコバクテリウム属は、重大なヒト病原体である放線菌類の例である。免疫不全の個体は、マイコバクテリア・アビウム(*Mycobacteria avium*)、マイコバクテリア・イントラセルラーレ(*Mycobacteria intracellulare*)、およびマイコバクテリア・スクロフラセウム(*Mycobacteria scrofulaceum*)による感染に特に感受性である。これらはすべて放線菌類に属する個々の種である。放線菌類には下記のものが含まれる：コリネバクテリウム・アクアティクム(*Corynebacterium aquaticum*)、コリネバクテリウム・ジェイキアム(*Corynebacterium*

jeikeum)、コリネバクテリウム・ゼロシス (*Corynebacterium zerosis*)、マイクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*)、プロピオニバクテリウム・アクネス (*Propionibacterium acnes*)、マイコバクテリア・ケローネ (*Mycobacteria chelonae*)、マイコバクテリア・テラエ (*Mycobacteria terrae*)、マイコバクテリア・イントラセルラーレ (*Mycobacterium intracellulare*)、マイコバクテリア・シミエ (*Mycobacteria simiae*)、マイコバクテリア・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリア・スクロフラセウム (*Mycobacterium scrofulaceum*)、マイコバクテリア・ゴルドネ (*Mycobacteria gordonae*)、マイコバクテリア・カンサシイ (*Mycobacteria kansasii*)、マイコバクテリア・スメガチス (*Mycobacteria smegmatis*)、マイコバクテリア・フォーチュイタム (*Mycobacterium fortuitum*)、マイコバクテリア・ガストリ (*Mycobacterium gastri*)、マイコバクテリア・ゼノピ (*Mycobacterium xenopi*)、マイコバクテリア・マリナム (*Mycobacterium marinum*) およびマイコバクテリア・フレイ (*Mycobacterium phlei*)。

【0079】

腸内細菌科に属する属のメンバーは、臨床微生物学の分野で最も病原性が高く、かつ最もよく遭遇する生物に含まれる。これらの大型グラム陰性桿菌は、膿瘍、肺炎、髄膜炎、細菌性赤痢、腸チフス、敗血症および食中毒を含む多様なヒト感染症の原因となる。この科の多様な種が類似の症状を引き起こす可能性があるため、感染症の同定、診断および処置には生化学的検査または核酸検査が重要である。腸内細菌科には下記のものが含まれる：シトロバクター・ダイバーサス (*Citrobacter diversus*)、シトロバクター・フロインディイ (*Citrobacter freundii*)、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、エンテロバクター・

アグロメランス (*Enterobacter agglomerans*)、エンテロバクター・クロアケ (*Enterobacter cloacae*)、エンテロバクター・フラギリス (*Enterobacter fragilis*)、エンテロバクター・ジェルゴビエ (*Enterobacter gergoviae*)、大腸菌、エシェリキア・ファークソニイ (*Escherichia fergusonii*)、エシェリキア・ハーマニイ (*Escherichia hermannii*)、ハフニア・アルベイ (*Hafnia alvei*)、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、クレブシエラ・オゼネ (*Klebsiella ozaenae*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラ・リノスクレロマトイス (*Klebsiella rhinoscleromatis*)、プロテウス・ミラビリス (*Proteus mirabilis*)、プロテウス・ペンネリ (*Proteus penneri*)、プロテウス・ブルガリス (*Proteus vulgaris*)、プロビデンシア・アルカリファシエンス (*Providencia alcalifaciens*)、プロビデンシア・レットゲリ (*Providencia rettgeri*)、プロビデンシア・スチュアルティイ (*Providencia stuartii*)、サルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella enteritidis*)、サルモネラ・パラティフィ (*Salmonella paratyphi*)、サルモネラ・ティフィ (*Salmonella typhi*)、サルモネラ・ティフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、セラチア・リクファシエンス (*Serratia liquefaciens*)、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、赤痢菌 (*Shigella sonnei*)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、エルシニア・インターメディア (*Yersinia intermedia*)、エルシニア・シュードツベルクローシス (*Yersinia pseudotuberculosis*) およびモルガネラ・モルガニイ (*Morganella morganii*)。

【0080】

腸球菌属のメンバーである細菌は消化管の正常菌叢の一部であるが、尿路感染症、創傷、腹膜炎、敗血症および心内膜炎を引き起こす可能性がある。この属は下記の種からなる3グループに下位分類される：グループI：エンテロコッカス・アビウム (*E. avium*)、エンテロコッカス・シュードアビウム (*E. pseudoavium*)、エンテロコッカス・マロドラタス (*E. malodoratus*) およびエンテロコッカス・ラフィノーサス (*E. raffinosus*)；グループII：エンテロコッカス・フェーカリス (*E. faecalis*)、エンテロコッカス・ソリタリウス (*E. solitarius*)、エンテロコッカス・ガリナラム (*E. gallinarum*)、エンテロコッカス・フェシウム (*E. faecium*)、エンテロコッカス・カセリフラブス (*E. casseliflavus*) およびエンテロコッカス・ムンチイ (*E. mundtii*)；グループIII：エンテロコッカス・デュランス (*E. durans*)、エンテロコッカス・ハイレ (*E. hirae*) およびエンテロコッカス・フェーカリス (*E. faecalis*) (asac)。現在まで、エンテロコッカス・ソリタリウスの1分離株、すなわちこれらの種の基準株があるにすぎない。ヒト感染症から分離された腸球菌の最近の国家研究で、エンテロコッカス・フェーカリスおよびエンテロコッカス・フェシウムの分離株は試料の98%を占めることが示された (Fackiam et al., 1985, 16章, 腸球菌属およびアエロコッカス属, p. 154-175, Lennette et al. (編) Manual of Clinical Microbiology, 第4版, American Society for Microbiology, ワシントンD. C.)。腸球菌属に属する細菌には下記のものが含まれる：エンテロコッカス・アビウム、エンテロコッカス・シュードアビウム、エンテロコッカス・マロドラタス、エンテロコッカス・ラフィノーサス、エンテロコッカス・フェーカリス、エンテロコッカス・ソリタリウス、エンテロコッカス・ガリナラム、エンテロコッカス・フェシウム、エンテロコッカス・カセリフラブス (*E. casseliflavus*) およびエンテロコッカス・ムンチイ、エンテロコッカス・デュランスおよびエンテロコッカス・ハイレ。本明細書に記載する

方法に用いたプローブは、エンテロコッカス・ソリタリウス以外のすべての腸球菌属菌種を特異的に検出した。

【0081】

ブドウ球菌属は、黄色ブドウ球菌と白色ブドウ球菌以外の2つの主グループに分類される。黄色ブドウ球菌は、軟組織感染症および毒素ショック症候群（TSS）の原因菌である。この生物はコアグラーゼ試験での陽性結果によりブドウ球菌属の他の種と区別される（他のすべての種が陰性である）。ブドウ球菌属の病原性は主にそれが産生する毒素に関連する。黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンは急激な食中毒を引き起こし、このため痙攣および激しい嘔吐を生じる可能性がある。感染は調理不十分な汚染肉が原因である場合が多い。これらの微生物はロイコシジン（leukocidin）をも分泌する。これは白血球を破壊し、膿およびアクネを形成する。より詳細には、黄色ブドウ球菌は肺炎、髄膜炎、フルンケル（boil）、関節炎および骨髄炎（慢性骨感染症）などの疾患の原因菌であることが見出された。ブドウ球菌属に属する細菌には下記のものが含まれる：黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・コーニイ（*Staphylococcus cohnii*）、スタフィロコッカス・デルフィ（*Staphylococcus delphi*）、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、スタフィロコッカス・ヘモリティカス（*Staphylococcus haemolyticus*）、スタフィロコッカス・ホミニス（*Staphylococcus hominis*）、スタフィロコッカス・ヒイカス（*Staphylococcus hyicus*）、スタフィロコッカス・インターメディウス（*Staphylococcus intermedius*）、スタフィロコッカス・サプロフィティカス（*Staphylococcus saprophyticus*）、スタフィロコッカス・シミュランス（*Staphylococcus simulans*）およびスタフィロコッカス・ワーネリ（*Staphylococcus warneri*）。

【0082】

カンピロバクター属菌種に分類される生物は、米国ですべての下痢症例の5～11%の原因となるグラム陰性細菌である。これらの生物は、彎曲した棒状細胞

から出る極鞭毛により細胞運動性をもつ。最も一般的なカンピロバクター属分離菌種はカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) であり、これは消化管感染症を引き起こす生物である。ヒトは一般に、調理不十分な鳥肉の摂食または汚染したミルクや水の飲用により、これらの生物に感染する。感染により、通常は発熱、痙攣および血性下痢が起きる。この生物はヒトの敗血症の原因となる可能性もある。カンピロバクター属菌種として分類される細菌には下記のものが含まれる：カンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリ (*Campylobacter coli*) およびカンピロバクター・ラリディス (*Campylobacter lariidis*)。

【0083】

生物間の系統発生関係の特徴づけるために、形態、色および代謝要件などの基準を用いることができるが、本発明の開発中に、分子遺伝学的分析に役立つ特に有用な一組の関係が確認された。これらの関係を図1～3に示す。

【0084】

図1に示すように、“汎細菌”アドレスおよび“汎真菌菌”アドレスのポリヌクレオチドプローブは、生物試料が細菌または真菌に由来するリボソーム核酸を含有するかを判定するのに有用である。細菌系列の微生物は、グラム陽性細菌に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするが、グラム陰性細菌に由来するリボソーム核酸にはハイブリダイズしないポリヌクレオチドプローブに対応するアドレスにおいて、グラム陽性菌またはグラム陰性菌に下位分類できる。興味深いことに、グラム陽性細菌類に属するある細菌はグラム染色法で陽性染色される能力を与える形質を失ったことが知られている。これらの細菌は染色によれば誤ってグラム陰性として分類されるであろうが、ポリヌクレオチド配列レベルではグラム陽性細菌の分子系統発生特性を保持している。特に有用な分類学的識別体は、放線菌類を同定するアドレスにおいてグラム陽性細菌を“低 (G+C)”と“高 (G+C)”または“放線菌類”に下位分類するものである。この細菌分類は、全ゲノムのグアニンとシトシン (G+C) のモル%を表すことを理解すべきである。図2は、高 (G+C) または低 (G+C) グループのグラム陽性細菌のメンバーとして下位分類した後、数種類の関連細菌を属レベル、さらには

種レベルにまで分類できる方法を具体的に示す。この図は、腸球菌属細菌を低（G+C）グループのグラム陽性細菌のメンバーとして下位分類学できる方式を示す。この図は、大腸菌を含めた数種類の異なる細菌種が腸内細菌科、すなわち”腸内細菌”グループのメンバーとして、共通の分子系統発生関係をもつ状態を具体的に示す。

【0085】

図1～3それぞれに示した矢印は、系統発生関係を示し、微生物を同定するための経路を確立する。たとえば図2は、黄色ブドウ球菌がブドウ球菌属のメンバーの細菌であり、低（G+C）サブカテゴリーのグラム陽性細菌のメンバーとして分類されることを示す。したがって、黄色ブドウ球菌に由来する rRNA は、汎細菌プローブ、グラム陽性細菌に対するプローブ、ブドウ球菌属に特異的なプローブ、および黄色ブドウ球菌に対する種特異的プローブにハイブリダイズすると予想される。この細菌は低（G+C）サブセットのグラム陽性細菌のメンバーであるので、高（G+C）サブセットのグラム陽性細菌に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションは予想されない。したがって、図1～3に示した関係は、プローブマトリックス中の種々のアドレスにおけるリボソーム核酸に対する陽性および陰性のハイブリダイゼーションプロファイルを予測するために使用できる。

【0086】

したがって本発明の1態様は、微生物の同定方法であって、リボソーム核酸標的配列に対する結合特異性をもつハイブリダイゼーションプローブを含むアドレスのコレクションにより、分子系統発生に基づいて生物を識別する方法に関する。本発明方法に使用できる特に好ましいプローブは下記のことができる：（1）細菌を真菌と識別する；（2）グラム陽性細菌をグラム陰性細菌と識別する；（3）高（G+C）サブセットのグラム陽性細菌を同定する；（4）腸内細菌科のメンバーである細菌を同定する；（5）腸球菌属として分類される細菌を同定する；（6）ブドウ球菌属のメンバーである細菌を同定する；（7）カンピロバクターグループのメンバーである細菌を同定する；（8）大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌の種レベル同定を行う。

種レベルでの微生物の陽性同定は種特異的プローブとの陽性のハイブリダイゼーション結果により指示されることを理解すべきである。これは、グラム陽性細菌としての微生物の陽性の同定についても言える。しかしグラム陰性細菌はグラム陽性細菌に特異的なプローブをハイブリダイズできないリボソーム核酸をもつ細菌サブセットとして同定される。グラム陰性細菌はグラム陽性細菌よりいくぶん分岐度が大きいので、グラム陰性細菌を同定するためのこの減法は、簡単かつきわめて好都合である。グラム陰性細菌の実質画分を同定するには数種類の異なるプローブを用いる必要があるが、グラム陽性細菌は単一プローブを用いて同定できる。ハイブリダイゼーション反応のプローブ数を限定すると、通常は不都合な交差ハイブリダイゼーションの可能性が少なくなる。それにもかかわらず、グラム陽性細菌のリボソーム核酸をグラム陰性細菌のリボソーム核酸と識別するために、グラム陰性細菌に特異的なポリヌクレオチドプローブを用いることができる。

【0087】

マトリックスに基づく微生物分類を実施するために有用な好ましいアドレスの組には、下記のものが含まれる：汎細菌アドレス；汎真菌アドレス；グラム陽性細菌とグラム陰性細菌を識別するためのアドレス；および放線菌類サブセットのグラム陽性細菌を同定するためのアドレス。さらに、腸内細菌科の細菌に対するアドレスはこれらの組のアドレスと組み合わせて用いるのに好ましい。このアドレスにより提供される追加情報は、グラム陰性細菌の分類に有用だからである。同様に、腸球菌属の細菌に対するアドレスも、低（G+C）グラム陽性細菌のカテゴリーに属する微生物のアイデンティティを洞察するのに有用である。他の有用なアドレスは、ブドウ球菌属のメンバーおよびカンピロバクターグループの細菌を同定する。最後に、マトリックスに基づくアッセイ法を用いた種レベルでの同定には下記のものが含まれる：大腸菌（腸内細菌科のメンバーであるグラム陰性細菌）に対する種特異的アドレス、黄色ブドウ球菌（ブドウ球菌属に属する低（G+C）サブセットのグラム陽性細菌のメンバー）に対する種特異的アドレス、カンジダ・アルビカンス（真菌）に対する種特異的アドレス、緑膿菌（グラム陰性細菌）に対する種特異的アドレス、および肺炎連鎖球菌（低（G+C）サ

ブセットのグラム陽性細菌のメンバー) に対する種特異的地址。これらのアドレスはそれぞれ、本明細書に記載するいずれかの試験デバイス中の特定の座に配置された1以上のポリヌクレオチドプローブで表すことができる。

【0088】

表4に、高次、中次および低次アドレスを含むきわめて好ましい3アドレスプローブマトリックスを幾つか示す。この表のエントリーは、タスク特異的プローブマトリックスの作製に使用できる特に好ましい組合わせのアドレスを幾つか具体的に示す。これらのマトリックスは、生物のアイデンティティーが既におおまかに決定している場合に最も有用である。より具体的には、表4に挙げたプローブマトリックスは、細菌生物(1~7列)、および真菌生物(8列)の解明に有用であろう。

【0089】

【表4】

表 4
3座マトリックスの例

高次アドレス	中次アドレス	低次アドレス
汎細菌	グラム陽性菌	放線菌類
グラム陽性菌	放線菌類	放線菌類アドレスにおいて 検出された細菌種 に対するプローブ
汎細菌	グラム陽性菌	グラム陽性菌アドレスにおいて 検出された細菌種 に対するプローブ
汎細菌	腸内細菌科	腸内細菌科アドレスにおいて 検出された細菌種 に対するプローブ
汎細菌	ブドウ球菌属	ブドウ球菌属アドレスにおいて 検出された細菌種 に対するアドレス
汎細菌	腸球菌属	腸球菌属アドレスにおいて 検出された細菌種 に対するアドレス
汎細菌	カンピロバクター属	カンピロバクター属アドレス において検出された細菌種 に対するアドレス
汎真菌	カンジダ属グループ	カンジダ属グループアドレス において検出された真菌種 に対するアドレス

【0090】

放線菌類サブセットのグラム陽性細菌の臨床的に重要な画分には、結核菌、マイコバクテリウム・ボビス、マイコバクテリウム・ボビスBCGおよびマイコバ

クテリウム・アフリカヌムが含まれ、これらは結核菌コンプレックス（TBコンプレックス）を構成する。この分類を図2に具体的に示す。TBコンプレックスの生物は、ヒトにおいて重大な罹患率および死亡率に関与する。結核菌はヒトから分離された最も一般的なTBコンプレックス病原体である。マイコバクテリウム・ボビスBCGは感染動物からヒトへ伝達される。マイコバクテリウム・アフリカヌムは熱帯アフリカで肺結核を引き起こす。米国特許第5,906,917号（その開示内容を本明細書に援用する）に、TBコンプレックスの同定に有用な2つの高特異的ハイブリダイゼーションプローブが示されている。第1プローブは配列GGTAGCGCTGAGACATATCCTCC（配列番号：42）をもち、配列CCGCTAACCACGACACTTTCTGTACTGCCTCTCAGCCG（配列番号：43）およびCACAAACCCCGCACACACAACCCCTACCCGGTTACCC（配列番号：44）をもつヘルパーオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用できる。第2プローブは配列CAGAACCTCCACACCCCCGAAG（配列番号：45）をもち、配列TGATTCTGTACGGGCGCCACACACGGGTACGGGAATATCAACCC（配列番号：46）およびCTACTACCAGCCGAAGTTCCCACGGAGCCC（配列番号：47）およびGGAGTTGATCGATCCGGTTTTGGGTGGTTAGTACCGC（配列番号：48）およびGGGTACGGGCCGTGTGTGTGCTCGCTAGAGGCTTTTCTTGCC（配列番号：49）をもつヘルパーオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用できる。これらのプローブは、プローブマトリックスにおいて放線菌類サブセットの細菌を同定するのにきわめて好ましい。より具体的には、きわめて好ましいプローブマトリックスはグラム陽性細菌、放線菌類およびTBコンプレックスに対するアドレスを含む。他のきわめて好ましいプローブマトリックスは、汎細菌生物、グラム陽性細菌およびTBコンプレックスに対するアドレスを含む。TBコンプレックスアドレスは、高次アドレス、たとえば汎細菌生物、グラム陽性細菌および放線菌類アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーションシグナルを生じることができる生物サブセットを同定できる。

リステリア・モノサイトゲネスは、放線菌類のメンバーではないグラム陽性細菌である。この生物は環境全体に分布する主に土壌細菌である。水源、農産物および動物中に発見されたこの生物がヒトの病原体であることは、50年以上前から認められている。それはリステリア症の病因菌であり、ヒトに髄膜炎、脳炎、敗血症および心内膜炎を引き起こす。米国特許第6,028,187号（その開示内容を本明細書に援用する）に、リステリア・モノサイトゲネスのリボソーム核酸をハイブリダイズするために使用できる高特異的ハイブリダイゼーションプローブが示されている。このプローブは配列CTGAGAA TAGTTTTATGGGATTAGCTCC（配列番号：50）をもち、配列GGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAA（配列番号：51）をもつヘルパーオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用できる。この配列はプローブマトリックスにおいてグラム陽性細菌サブセットの同定に有用である。ハイブリダイゼーション操作の実施にきわめて好ましいプローブマトリックスには、グラム陽性細菌およびリステリア・モノサイトゲネスに対するアドレスが含まれる。他のきわめて好ましいプローブマトリックスには、汎細菌生物、グラム陽性細菌およびリステリア・モノサイトゲネスに対するアドレスが含まれる。リステリア・モノサイトゲネスのアドレスは、高次アドレス、たとえば汎細菌アドレスおよびグラム陽性菌アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーションシグナルを生じる生物サブセットを同定できる。

【0092】

高次アドレスおよび中次アドレス、たとえば汎細菌アドレスおよびグラム陽性菌アドレスと組み合わせて使用できる他の好ましい低次アドレスには、黄色ブドウ球菌に対するアドレスおよび肺炎連鎖球菌に対するアドレスが含まれる。

【0093】

大腸菌アドレスは低次アドレスとして、汎細菌生物に対するアドレスおよび腸内細菌科の細菌に対するアドレスと組み合わせて使用できる。

黄色ブドウ球菌アドレスは低次アドレスとして、汎細菌生物に対するアドレスおよびブドウ球菌属の細菌に対するアドレスと組み合わせて使用できる。

【0094】

前記の3アドレスマトリックスのいずれかに追加できる好ましいアドレスには、汎真菌生物の同定のためのアドレス、および真菌生物の特定の種、たとえばカンジダ・アルビカンスの同定のためのアドレスが含まれる。

【0095】

汎真菌生物および酵母種カンジダ・アルビカンスの同定のためのプローブのほかに、プローブマトリックスの構成要素として真菌の分類に使用できる別のプローブがきわめて好ましい。より具体的には、あるきわめて好ましいプローブマトリックスは、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・デュブリニエンシス、カンジダ・ビスワナチイおよびカンジダ・パラプシローシスを含めた複数のカンジダ属菌種に由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするが、他の種、たとえばカンジダ・クルセイ (*C. krusei*) またはカンジダ・グラブラタ (*C. glabrata*) に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズしないポリヌクレオチドプローブを含む。このハイブリダイゼーション特異性は、配列 GCGTCAATAAAGAACAAACCGATCC (配列番号: 55) をもつプローブにより得られる。このプローブを配列 TAGTCGGCATAGTTTATGGTTAAGAC (OMeT) (配列番号: 56) および配列 CCCAGAACCCAAAGACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGATT (配列番号: 57) をもつヘルパーオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用できる。これらのポリヌクレオチドは、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・デュブリニエンシス、カンジダ・ビスワナチイおよびカンジダ・パラプシローシスに由来するリボソーム核酸を特異的にハイブリダイズするアドレスをもつプローブマトリックスの構成要素としてきわめて好ましい。明らかに、このアドレスは汎真菌アドレスおよびカンジダ・アルビカンスを同定したアドレスの組合わせに対して中次アドレスとみなされる。つまり、本明細書に記載する要件および指針に適合するきわめて好ましい3アドレスプローブマトリックスは、下記のものを含む: (1) 複数の真菌種に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするが、細菌種に由来するものはハイブリダイズしない汎真菌アドレス、(2) カンジダ・アルビカンス、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・デュブリニエンシス、カンジダ・ビスワナチイおよ

びカンジダ・パラプシローシスを含めた複数のカンジダ属菌種に由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするカンジダグループアドレス、ならびに(3)カンジダ・アルビカンスに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするカンジダ・アルビカンスアドレス。

【0096】

カンジダ・アルビカンスのリボソーム核酸を特異的に同定するためのプローブマトリックスとして、別のハイブリダイゼーションプローブを使用できる。たとえば配列CGGCCATAAAGACCTACCAAGCG(配列番号:52)をもつプローブは、配列CCAGTTCTAAGTTGATCGTTAAACGTGCCCCGGA(配列番号:53)および配列TGTCCTACAGCAGCATCCACCAGCAGTCCGTCGTG(配列番号:54)をもつヘルパーオリゴヌクレオチドと組み合わせて、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・ビスワナチイ、カンジダ・グラブラタ、カンジダ・クルセイまたはカンジダ・パラプシローシスのリボソーム核酸を実質的にハイブリダイズせずに、多数のカンジダ・アルビカンス株およびカンジダ・デュブリニエンシスに由来するリボソーム核酸をハイブリダイズするために使用できる。これらのポリヌクレオチドは、プローブマトリックスにおいてカンジダ・アルビカンスおよびカンジダ・デュブリニエンシスを特異的に同定するアドレスを含む構成要素としてきわめて好ましい。

【0097】

非病原性ブドウ球菌属細菌を同定できる、細菌間の系統発生の違いを利用した特に有用な分類方式を開発した。まずブドウ球菌属プローブを用いて広範なブドウ球菌属細菌のメンバーとして生物を同定した。種特異的プローブを独立して用いて、黄色ブドウ球菌を同定した。これら2プローブのハイブリダイゼーションプロファイルについての知識を用いて、本明細書において”Staph-Not-Aureus”(SNA)と呼ぶ細菌グループを同定できる。これは偽陽性血液培養の最も一般的な原因の1つである細菌の臨床関連同定である。黄色ブドウ球菌は血液培養中に検出されると”真の病原体”とみなされるが、黄色ブドウ球菌ではない菌種のブドウ球菌属細菌は一般に採血中に意図せずに採取された汚染

皮膚細菌であると考えられる。

【0098】

したがって、ブドウ球菌属細菌の同定についてのきわめて有用な情報は、ブドウ球菌属に特異的なプローブをハイブリダイズするリボソーム核酸をもつ細菌が黄色ブドウ球菌種特異的プローブをもハイブリダイズするかを判定することにより得られる。ブドウ球菌属プローブをハイブリダイズする rRNA または rDNA をもつが、黄色ブドウ球菌種特異的プローブをもたない細菌を、いずれも SNA として分類する。血液培養ボトルが SNA 細菌を含む場合、その所見は、ドナーから血液を採取するとき適切に微生物を除去しなかった皮膚表面からの細菌が接種された偽陽性培養の可能性のあることを指示するであろう。これは、分子系統発生分岐点に対する特異性をもつハイブリダイゼーションプローブのコレクションを、微生物を属のメンバーまたは種として同定するために利用できることについての簡単な例である。

【0099】

病原性黄色ブドウ球菌と皮膚からの無害なブドウ球菌属細菌を識別するための別法は、標準凝固試験の実施を伴う。大部分の黄色ブドウ球菌培養物は凝固するが、無害なブドウ球菌属細菌の培養物は通常はこの特性を示さない。凝固しないこれらの無害なブドウ球菌属細菌を” コアグラゼ陰性 Staph ” または” CONS ” と呼ぶ。陽性コアグラゼ試験を示す能力も、同一細菌種についての市販試験間で異なる。したがって、本明細書に記載する微生物同定方法は、黄色ブドウ球菌特異的ハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズしないブドウ球菌属細菌サブセットとして CONS を同定する工程を含むことが有利である。

【0100】

黄色ブドウ球菌ではないブドウ球菌属菌のリボソーム核酸を検出するためのプローブマトリックスは、ブドウ球菌属のメンバーである細菌を検出するためのアドレス、および黄色ブドウ球菌種を検出するためのアドレスを含む。便宜上、汎細菌生物のリボソーム核酸をハイブリダイズするためのアドレスを含めることができる。汎細菌アドレス、ブドウ球菌属アドレスおよび黄色ブドウ球菌アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、被験試料中に黄色ブドウ球菌が

存在することを示すであろう。逆に、黄色ブドウ球菌ではないブドウ球菌属菌（”SNA”）の存在は、汎細菌アドレスおよびブドウ球菌属アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果、ただし黄色ブドウ球菌アドレスにおいては陰性の結果により指示されるであろう。もちろん、さらに汎真菌生物に対するアドレスおよびカンジダ・アルビカンス種に対するアドレスを含めることにより、このマトリックスの有用性を拡大することができる。事実、きわめて好ましいプローブマトリックスは下記のものを含む：（１）汎細菌アドレス、（２）ブドウ球菌属に属する細菌に対するアドレス、（３）黄色ブドウ球菌種に対するアドレス、および（４）汎真菌生物に対するアドレス。所望により、カンジダ・アルビカンス種に対する追加アドレスを含めることもできる。さらにいっそう好ましいプローブマトリックスにおいては、これらのアドレスを１またはそれ以上の共通座において組み合わせる。本発明のこの後者の態様を”ハイブリダイゼーションプローブ多重化”と呼ぶ。

【0101】

ハイブリダイゼーションプローブ多重化

本発明の他の態様は、”多重化（multiplexing）”態様のプローブハイブリダイゼーション方法に関する。多重化は、試験デバイスの単一座において物理的に結合した複数の核酸プローブを表す。したがってこの座における質的に陽性のハイブリダイゼーションシグナルは、プローブの１つが標的にハイブリダイズしたことを指示するが、複数のプローブのうちどれがハイブリダイズしたかは指示しない。試験デバイスの単一座は、１またはそれ以上のリボソーム核酸配列の存在または不存在を指示ために使用できる複数のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを収容できるので、物理的な座およびその座において陽性のハイブリダイゼーションシグナルにより同定された微生物のタイプの両方を、本明細書においては”アドレス”と呼ぶ。

【0102】

本発明の開発に際して、幾つかの核酸プローブを同一ハイブリダイゼーション反応に組み合わせることができ、これにより１以上の異なるタイプの微生物が生物試料中に存在したか否かを判定するのに有用な結果が得られることを見出した

。たとえば、腸内細菌科の細菌に対して特異的なプローブおよび腸球菌属の細菌に対して特異的なプローブを第1の共通座において組み合わせることができる。プローブマトリックスにおいて同定すべきすべての微生物に対するハイブリダイゼーションプロファイルのユニークさは、この組合わせにより損なわれないからである。同様に、ブドウ球菌属に属する細菌およびカンピロバクターグループに属する細菌に対して特異的なプローブを第2の共通座において組み合わせても、ハイブリダイゼーションプロファイルのユニークさは損なわれない。有利には、異なる微生物を同定するためのユニーク経路として用いられる複数のアドレスをプローブマトリックスが含む場合、微生物の混合培養物を検出および解明することが可能になる。

【0103】

プローブマトリックス法に関しては陰性のハイブリダイゼーション結果が意味をもつので、特定のアドレスを共通の座において組み合わせても、ハイブリダイゼーション結果からきわめて有用な情報を得る能力は損なわれない。下記のものを含むプローブマトリックスを考慮することにより、この点について説明することができる：(a) 汎細菌アドレス、(b) グラム陽性細菌に対するアドレス、(c) 細菌種黄色ブドウ球菌に対するアドレス、(d) 汎真菌生物に対するアドレス、および(e) 真菌種カンジダ・アルビカンスに対するアドレス。ハイブリダイゼーション結果から得られる情報の統合性を損なうことなく、下記のように4座を用いてこのマトリックスを構成することができる：(1) 汎細菌アドレス、(2) 汎真菌アドレス、(3) グラム陽性菌アドレス、ならびに(4) 黄色ブドウ球菌およびカンジダ・アルビカンスに対するアドレス。この例では、2種のアドレスを組み合わせることができる。共通座における陽性のハイブリダイゼーション結果は、必然的に(1) 汎細菌アドレスおよびグラム陽性菌アドレス、または(2) 汎真菌アドレスのいずれかにおいて陽性の結果を伴わなければならないからである。前者のハイブリダイゼーション結果を種アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果と合わせて考慮すると、被験生物が細菌黄色ブドウ球菌であったことが指示されるであろう。逆に、後者のハイブリダイゼーション結果は、生物が酵母カンジダ・アルビカンスであったことを指示するであろう。

これは、1種より多い生物を同定する単一アドレスにおけるハイブリダイゼーション結果から、種由来のリボソーム核酸を判定できることを説明する。

【0104】

事実、複雑なマトリックスを用いる場合にも、マトリックスの単一アドレスにおいて種特異的プローブのコレクションを組み合わせることが好ましい。好ましい種プローブのコレクションは、たとえば大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンス、緑膿菌および肺炎連鎖球菌の rRNA に対する特異性をもつプローブが含まれる。この場合も、この種プローブコレクションに対応するマトリックスアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、マトリックスの他のアドレスにおける結果を考慮することによって容易に解明されるであろう。しかし、プローブマトリックス中の単一アドレスに配置された種特異的プローブがハイブリダイズした核酸はプローブマトリックス中の少なくとも1つの他のアドレスにより得られる情報の同定によって互いに識別されなければならないということが重要である。たとえば、異なる微生物種に対する特異性をもつプローブのコレクションに対応するアドレスはそれぞれ、他のアドレスのうち高次関係のユニークパターンに対応しなければならない。プローブマトリックス中の種々のアドレスにおける陽性または陰性のハイブリダイゼーション結果のプロフィールは、“ルックアップ表”を利用して容易に解明される。

【0105】

マトリックスに基づくハイブリダイゼーション反応において同一座に組み合わせることができるプローブの決定は、ルーティンに実施できる。事実、科学文献から容易に確認できる既知の分子系統発生関係に基づいて、いかなる当該細菌にも特定のマトリックス中のアドレスコレクションそれぞれに対する予想陽性—および陰性—ハイブリダイゼーション結果のプロフィールを帰属させることができる。マトリックス中の種特異的ハイブリダイゼーションプローブに対応する各微生物種は、それらの種を曖昧ではなく同定するためには陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果のユニークプロフィールにより同定できなければならない。

。

【0106】

物理的に別個の座において実施するハイブリダイゼーションに用いるのに好ましい特定のプローブとは別に、マトリックス中の残りのプローブを任意の組合わせで混合することができる。ただし、そのような組合わせにより2つの異なる種特異的プローブが共通のハイブリダイゼーションプロファイルで表わされるマトリックスが得られる場合は、これらのプローブを同一座において組み合わせない。たとえば、汎細菌生物、グラム陽性細菌、放線菌類サブセットのグラム陽性細菌、およびブドウ球菌属に対するアドレスをもつプローブマトリックスに、黄色ブドウ球菌と上皮ブドウ球菌の両方に対する種特異的プローブを表す単一アドレスがあってはならない。このマトリックスではこれら2つの種に対するハイブリダイゼーションプロファイルを識別できないからである。したがって、種レベルでの同定を望む場合、それぞれの種同定に対応する陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果のプロファイルをそのマトリックスにおける他のすべてのプロファイルと識別できる限り、プローブを共通アドレスにおいて組み合わせることができる。属レベルでの分類を含めた高次系統発生分類についても同じことが言える。

【0107】

異なる種の生物に由来する核酸を検出する識別可能な標識をハイブリダイゼーションプローブに用いない限り、複数種のプローブに対応するアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルはどの種のプローブがこのハイブリダイゼーションに関与しているかを曖昧にではなく同定することはできないことを留意すべきである。そのような場合、ハイブリダイズしたプローブのレベルに達する解明は、この結果をプローブマトリックス中の種々のアドレスにおける他の結果との関連で解釈することによる。

【0108】

最後に、本明細書に記載する多重化ハイブリダイゼーション法は、アッセイの実施における計測器の複雑さが最小になるので、さらに他の利点をもつ。より具体的には、本発明方法はプロトコルの実施またはアッセイ結果の読取りのための複雑な実験装置を必要としない。この方法は標準的な臨床アルゴリズムおよびデバイスプラットフォームに適合するので、このアッセイに専用の高価な装置は必

【0 1 0 9】

プローブマトリックスの多重化は、これに応じて多量のハイブリダイゼーションデータを比較的少数の座から得るための手段を提供する。4座をもつ多重構成の前記アドレスを用いた有用なプローブマトリックスの例は、下記の構造をもつ：

単一微生物の生物試料が細菌生物と真菌生物の両方を同時に含有することはないので、第3座および第4座における細菌または真菌の中次アドレスと低次アドレスを交換して、下記の構造をもつマトリックスを得ることができる：

これら2例の多重ハイブリダイゼーションプローブは、本発明による好ましいプローブマトリックスを表す。これらのマトリックスは、細菌生物のリボソーム核酸に特異的な3つのアドレスおよび真菌生物のリボソーム核酸に特異的な3つのアドレスを含む。細菌門および真菌門のそれぞれに対するアドレスは、互いに

高次、中次および低次アドレスに関連する。これらのマトリックスは、異なる上位界に属する生物に対する高次アドレスを同一プローブマトリックス中へ組み合わせた具体例をも示す。最後に、これらのマトリックスにおけるアドレスの多重化により、わずか4つの座に6つのアドレスをもつデバイスを構成することができる。

【0110】

オリゴヌクレオチドの化学構造

プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作を実施するのに有用なオリゴヌクレオチドを、それらの性能を高めるための基で修飾してもよい。したがって、“オリゴヌクレオチド”または“オリゴヌクレオチドプローブ”または“ヘルパーオリゴヌクレオチド”または単に“プローブ”という表現は、天然ヌクレオチドのポリマーおよび少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含むポリマーを包含すると理解すべきである。

【0111】

主鎖修飾オリゴヌクレオチド、たとえばホスホロチオエート基またはメチルホスホナート基をもつものは、本発明のオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用できる類似体の例である。これらの修飾により、オリゴヌクレオチドはあるポリメラーゼのヌクレオチド分解活性またはヌクレアーゼ酵素に対して耐性になる。本明細書に開示するオリゴヌクレオチドの構造中へ組み込むことができる他の類似体には、ペプチド核酸、すなわち“PNA”が含まれる。PNAは、ホスホジエステル主鎖にではなくペプチド主鎖に結合したリガンドを含む化合物である。代表的なリガンドは、適切なリンカーによりペプチド主鎖に結合した4つの主な天然DNA塩基（すなわちチミン、シトシン、アデニンまたはグアニン）または他の天然核酸塩基（たとえばイノシン、ウラシル、5-メチルシトシンまたはチオウラシル）または合成塩基（たとえばプロモチミン、アザアデニンまたはアザグアニンなど）を含む。PNAは相補的な一本鎖DNAおよびRNA鎖を結合することができる。PNAの製造方法および使用方法は米国特許第5,539,082号に開示されている。本明細書に記載する配列をもつオリゴヌクレオチドの製造に使用できる他のタイプの修飾は、核酸鎖中のヌクレオチド間に組み込んだ、

プライマーの延長を妨害しない非ヌクレオチドリinker（たとえばArnoldら、”ヌクレオチドプローブのための非ヌクレオチド結合剤”、米国特許第6,031,091号、本明細書に援用する）の使用を伴う。

【0112】

有用なポリヌクレオチドプローブの例

本明細書に記載する方法により微生物を同定するために用いるポリヌクレオチドプローブは、一般に特定のグループまたは種の微生物のrRNAまたはrDNAを高特異的にハイブリダイズする。たとえば真菌生物をハイブリダイズせずに全部またはほぼ全部の既知細菌種のrRNAを特異的にハイブリダイズする”汎細菌”プローブは、生物試料が細菌を含有するか否かを判定するために使用できる。同様に、細菌性rRNAをハイブリダイズせずに全部またはほぼ全部の既知真菌種のrRNAを特異的にハイブリダイズする”汎真菌”プローブは、rRNA試料が真菌を含有することを判定するために有用である。表5に、本発明の説明に用いたプローブのポリヌクレオチド配列を示す。もちろん、この表に示したプローブの代わりに他のプローブを使用できることは、当業者に自明であろう。

【0113】

【表5】

表 5

プローブおよびヘルパーオリゴヌクレオチド配列の例

ターゲット rRNA	機能	配列
汎細菌	プローブ	CGACAAGGAATTCGC (配列番号:1)
	ヘルパー	TACCTTAGGACCGTTAT (配列番号:2)
	ヘルパー	CAGGTCGGAACCTTACC (配列番号:3)
汎真菌	プローブ	GTCTGGACCTGGTGAGTTCCC (配列番号:4)
	ヘルパー	CGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGC (配列番号:5)
	ヘルパー	GCTCTCAATCTGTCAATCCTTATTGT (配列番号:6)
グラム陽性菌	プローブ	GAGGGAACCTTTGGGCGC (配列番号:7)
	ヘルパー	CTCCGTTACCTTTTAGGAGGCGACCGCCC (配列番号:8)
	ヘルパー	CTCCGTTACATTTTAGGAGGC (配列番号:9)
高(G+C)サブセット グラム陽性菌 (放線菌類)	プローブ	CGAGCATCTTTACTCGTAGTGCAATTCG (配列番号:10)
	ヘルパー	CCGAGTCTGTGGTTGAGACAGTGGG (配列番号:11)
	ヘルパー	GGTCTTCCGTCCTGCCGCGCGTAA (配列番号:12)
腸内細菌科 (腸内細菌)	プローブ	CCGCTTGCTCTCGCGAG (配列番号:13)
	ヘルパー	GTGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGC (配列番号:14)
	ヘルパー	GGACTACGACGCACTTTATGAGGT (配列番号:15)
腸球菌種	プローブ	CTCCTAGGTGCCAGTCAAATTTG (配列番号:16)
	ヘルパー	TCTACGGGGCTTTTACCCTTTCTAGCAGACC (配列番号:17)
	ヘルパー	CCTCGTGTTCCGCGTACTCAGGATC (配列番号:18)
腸球菌種	プローブ	CATCATTCTCAATCCGAGGC (配列番号:19)
	ヘルパー	TAGCCCTAAAGCTATTTCCGAGAGAACCAGCTATCTCC (配列番号:20)
	ヘルパー	CCCTAGTCCAAACAGTGCTCTACCTC (配列番号:21)
ブドウ球菌属	プローブ	CCGAAGTGAGAACAACCTTATGGGATTGTC (配列番号:22)
	ヘルパー	TTGACCTCGCGGTTTCG (配列番号:23)
	ヘルパー	GCGATTCCAGCTTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAAT (配列番号:24)
カンピロバクター種	プローブ	GGTTCTTAGGATATCAAGCCCAGG (配列番号:25)
	ヘルパー	GTCTCTAAGTTCTAGCAAGCTAGCACCCCTCATATCTCTA (配列番号:26)
大腸菌	プローブ	GGGTAACGTCAATGAGCAAAGGTATTAAC (配列番号:27)
	ヘルパー	TTTACTCCCTTCTCCTCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCG (配列番号:28)
	ヘルパー	CACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTC (配列番号:29)
肺炎連鎖球菌	プローブ	CAAAGCCTACTATGGTTAAGCC (配列番号:30)
	ヘルパー	ACAGCCTTTAACTTCAGACTTATCTAACCGCCTGCGC (配列番号:31)
	ヘルパー	TCTCCCTCTTGCCTCAAGTTAAACAGTTTC (配列番号:32)
緑膿菌	プローブ	CCCAGAGTGATACATGAGGCG (配列番号:33)
	ヘルパー	CCCTAGCCGAAACAGTTGCTCTACCC (配列番号:34)
	ヘルパー	CTACCTAAATAGCTTTCGAGGAGAACCAGCTATCTC (配列番号:35)
カンジダ・ アルビカンス	プローブ	GCTGGCCTGAAAAATCAAGCACG (配列番号:36)
	ヘルパー	TTGAAACGGAGCTTCCCATCTCTTAGGATCGACTAACCC (配列番号:37)
	ヘルパー	CCAAGTTCGGAAATTTAACCGGATTCCCTTTCGATG (配列番号:38)
黄色ブドウ球菌	プローブ	CCACTCAAGAGAGACAACATTTTCGACTAC (配列番号:39)
	ヘルパー	GATGATTCGTCTAATGTCGACCTTTGTAAGTCC (配列番号:40)
	ヘルパー	CGGAATTTACGTCGCTCCGTCGTAAGGAT (配列番号:41)

【0114】

表5に示したプローブおよびヘルパーは、表に示した対応する標的 rRNA を

特異的にハイブリダイズし、したがって分類学的識別体の具体例に関連して前記に挙げた生物コレクションを同定した。

【0115】

本発明のデバイスおよび方法を特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて説明したが、他の核酸プローブを代わりに用いても同様に良好な結果が得られることを理解すべきである。たとえばHoganら、米国特許第5,541,308号（本明細書に援用する）は、系統発生上の広範な断面の細菌を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ法に使用できるオリゴヌクレオチドプローブのコレクションを教示している。このプローブコレクションを、別態様のプローブマトリックス中の汎細菌アドレスに使用できる。プローブマトリックスにおいて汎細菌生物のリボソーム核酸を検出するためのアドレスに用いた別態様のハイブリダイゼーションプローブは、配列GGAACTTACCCGACAAGGAATTTCTGCTACCTTAGG（配列番号：58）をもち、配列ACCGTTATAGTTACGGCCGCGCTTTACCGGGGCTTC（配列番号：59）およびGCCTGGCCATCATTACGCCATTCTGTGCAGGTC（配列番号：60）および配列GCCCCAAATCGTTACGCCCTTTCGTGCGGGTC（配列番号：61）をもつヘルパーオリゴヌクレオチドと組み合わせて使用できる。これらのポリヌクレオチドは、汎細菌生物を同定するアドレスをもつプローブマトリックスの構成要素としてきわめて好ましく、実施例に記載する汎細菌プローブの代わりに用いて同様に良好な結果を得ることができる。米国特許第5,541,308号にはさらに、多数の真菌生物のrRNAと反応性であるオリゴヌクレオチドプローブが教示されている。同様に、Weissburgら、米国特許第5,403,710号（本明細書に援用する）には、大部分の真菌に由来する核酸をハイブリダイズする2つの”汎属（pan-generic）”プローブが開示されている。これら後者の組のプローブはいずれも、別態様のプローブマトリックスにおいて汎真菌アドレスに使用できる。米国特許第5,635,348号（本明細書に援用する）には、グラム陽性およびグラム陰性細菌の同定に有用なプローブの配列が開示されている。高（G+C）サブセットのグラム陽性細菌の同定に有用なオリゴヌクレオチドハイブリダイゼー

ションプローブが、Roller et al., J. Gen. Micro., 138:1167 (1992) および Microbiology, 140:2849 (1994) に示されている。Sheinessら、米国特許第5,776,694号(本明細書に援用する)には、腸内細菌科に対して特異性をもつプローブが教示されている。Hoganら、米国特許第5,674,684号(本明細書に援用する)には、腸球菌属の rRNA に対して結合特異性をもつハイブリダイゼーションプローブが開示され;カンピロバクター属の rRNA に対して結合特異性をもつ別のハイブリダイゼーションプローブが開示および特許請求されている。したがって当業者には、表5に記載したもの以外の核酸プローブを本明細書に開示するマトリックスに基づくハイブリダイゼーション方法の実施に使用できることが理解されるであろう。

【0116】

前記の表に示したように、プローブマトリックスハイブリダイゼーションを実施するために数種類の異なる種特異的プローブを使用できる。本発明を説明するために大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌を同定するための種特異的プローブを用いた。本明細書に詳述した実施例に用いた組に他の種特異的プローブを追加し、または代わりに使用できることは、当業者に自明であろう。もちろん、種特異的プローブの選択は、マトリックス中の種々のアドレスにおける陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果のプロフィールがそれぞれの種特異的プローブにユニークであることを前提とする。種レベルでの同定を望む場合には、異なる種特異的プローブにより表される2種類の微生物は、他のすべてのアドレスにおいて一致するハイブリダイゼーションプロフィールをもつべきでない。

【0117】

有用なポリヌクレオチドの標識、ハイブリダイゼーションおよび検出システム

特異的な核酸ハイブリダイゼーションを監視するために使用できる、本質的にすべての標識および検出システムを、本明細書に開示するプローブマトリックスと組み合わせて使用できる。有用な標識のコレクションに含まれるのは下記のも

のである：オリゴヌクレオチドに結合した放射性標識、酵素、ハプテン、結合オリゴヌクレオチド、化学発光分子およびレドックス活性部分など、電子検出方法で検出できるものである。好ましい化学発光分子には、Arnoldら、米国特許第5,283,174号に開示されたタイプの同属保護アッセイ(homogenous protection assay)に関して使用するための、およびWoodheadら、米国特許第5,656,207号に開示されたタイプの単一反応で複数の標的を定量するアッセイに関して使用するための、アクリジニウムエステルが含まれる。これらの特許明細書に含まれる開示内容を本明細書に援用する。好ましい電子標識および検出方法は米国特許第5,591,578号および第5,770,369号、ならびにWO98/57158に開示されており、それらの開示内容を本明細書に援用する。本発明において標識として有用なレドックス活性部分には、遷移金属、たとえばCd、Mg、Cu、Co、Pd、Zn、FeおよびRuが含まれる。

【0118】

本明細書に記載する方法に従って作製したプローブマトリックスが分子系統発生分析に基づく分析方法を用いて選択された非ランダム配列をもつことは明らかであろう。本発明のプローブは、好ましくは14~45ヌクレオチド、より好ましくは16~30ヌクレオチドの長さをもつが、長さ100ヌクレオチドという長いものであってもよい。ヘルパーオリゴヌクレオチドも、好ましくは同様な長さをもつであろう。本発明のプローブマトリックスが非ランダム配列をもつという事実は、遺伝子発現研究の実施に用いられる種類の”DNAマイクロチップ”上の高密度アレイに配置される短いランダムオリゴヌクレオチド配列(Science, 282:396(1998))と対照的である。

【0119】

本明細書に開示するハイブリダイゼーション操作の実施に有用な高ストリンジェント条件には、塩類濃度が0.6~0.9Mである場合は55~65℃の条件が含まれる。好ましい塩類には塩化リチウムが含まれるが、他の塩類、たとえば塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウムもハイブリダイゼーション溶液中に使用できる。あるいは他の高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、0

、48Mリン酸ナトリウム緩衝液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、ならびに各1mMのEDTAおよびEGTAにより、または0.6M LiCl、1%ラウリル硫酸リチウム、60mMコハク酸リチウム、ならびに各10mMのEDTAおよびEGTAにより得られる。プローブマトリックスに用いるすべてのプローブが互いに15℃以内のT_m値をもつことが好ましい。さらに、約60℃でのハイブリダイゼーションに最適化したプローブマトリックスに用いるすべてのプローブが63~78℃のT_m値をもつことが好ましい。

【0120】

本明細書に開示するハイブリダイゼーション方法に使用できる核酸を微生物から放出させるのに適した方法がClarkら、米国特許第5,837,452号およびKacianら、米国特許第5,364,763号に開示されていることを留意する。これらの特許の開示内容を本明細書に援用する。

【0121】

ハイブリダイゼーション反応の実施に有用な装置

微生物の同定のためのマトリックスに基づく方法は、幾つかの異なるタイプの検査フォーマットのいずれかを用いて実施できる。ハイブリダイゼーションの実施に使用できるフォーマットの例には下記のものが含まれるが、これらに限定されない：1またはそれ以上のプローブを異なる試験管に収容された他のプローブまたはプローブコレクションから物理的に隔離できる個別の試験管；96ウェルその他のマルチウェルマイクロタイタープレートのウェル；および固体支持体、たとえばポリヌクレオチドプローブが間隔をおいた構造で支持体に固定化されたディップスティックまたは”DNAチップ”。

【0122】

本発明の核酸検査系による微生物の同定は、有利にはいずれの*in vitro*増幅工程も必要なく実施できる。たとえばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による予備増幅を用いる別態様の微生物同定系は、環境からの汚染による偽陽性結果を生じやすいと考えられる。これらの偽陽性結果は、不適切な臨床検査サンプリング技術、高増幅レベルをもつ増幅反応からの、または検体処理もしくは核酸増幅に用いた実験試薬の汚染からのキャリーオーバー汚染のため生じる可能性が

ある。生物試料に由来するポリヌクレオチドをまず *in vitro* 増幅工程で処理することなくプローブマトリックスハイブリダイゼーション操作に用いると、これらの難点をすべて避けることができる。

【0123】

マトリックスに基づくハイブリダイゼーション操作の1方法によれば、プローブを識別可能な標識で標識できる。本明細書に記載する方法の実施に使用できる特に好ましい化学発光標識の例は、Woodheadら、米国特許第5,756,011号（その開示内容を本明細書に援用する）に開示されたアクリジニウムエステル（AE）標識である。より具体的には、発光後の異なる時点でピークエネルギーを放出する化学発光標識で独立して標識された別個のプローブを、単一アドレスが含むことができる。本発明に関して有用な識別可能なプローブの作製および使用に利用できる材料および方法は、米国特許第5,756,011号にみられ、その開示内容を本明細書に援用する。励起により種々の波長の光を発する蛍光標識は、本明細書に記載する方法に関して使用できる識別可能な標識のさらに他の例である。この方法で、識別可能な標識を用いた2つのプローブは、それらを試験デバイスの同一座において組み合わせた場合ですら、識別できる。したがって、多数の異なるプローブを単一アドレスにおいて組み合わせても、異なるプローブまたはプローブ組についてのハイブリダイゼーション結果をなお識別できる。

【0124】

プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作を実施するためのキット

プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作を実施するために用いる材料をキットに組み込み、これを診断操作の実施に使用できる。これらのキットは、被験生物に由来する核酸をハイブリダイズするための複数のプローブを含む少なくとも1つのデバイス、およびこのデバイスを用いて核酸ハイブリダイゼーション操作を実施するための指示を含む。このデバイスは、被験微生物のリボソーム核酸をハイブリダイズするための、本質的に本明細書に開示する複数の高次アドレスおよび低次アドレスを含む。これらのアドレスは本明細書に具体的に開示するアドレスに相当するものであってもよいが、高次、中次および低次アドレス

の関係が維持される限り、異なるアドレスをも含むことができる。キットは所望により、種々のアドレスを構成するプローブと、このデバイスで検査しようとする生物試料から得た標的リボソーム核酸との特異的ハイブリッドを検出するための指示を含むことができる。この指示は印刷された指示書であってもよく、コンピューター読み出し可能な媒体、たとえば磁気ディスクまたは光ディスクに記憶させた指示であってもよい。

【0125】

ハイブリダイゼーション結果を解釈するための分析デバイス

プローブマトリックスハイブリダイゼーションからの結果は、手動で、またはコンピューターもしくはデータプロセッサ（“プロセッサ”）を用いて解釈または分析できる。ハイブリダイゼーション操作で得た結果をユーザーインターフェース、たとえばキーボードによりプロセッサに入力するか、あるいは自動デバイス、たとえばマシーンインターフェースを介してプレートリーダー、フィルムスキャナーまたはルミノメーターから直接入力することができる。次いでプロセッサが陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果をソーティングして、プロフィールを確立する。次いでこのプロフィールを、コンピューターに接続したメモリーデバイスに記憶させたルックアップ表と比較する。ルックアップ表は、種々の微生物のアイデンティティーについてのハイブリダイゼーション結果の種々のプロフィールを集めたものである。この方法で、プローブマトリックスを用いて測定したハイブリダイゼーションプロフィールを、ハイブリダイゼーション操作の実施に用いた核酸源であった生物のアイデンティティー、または1より多くの以上の生物に特徴的な曖昧な結果の場合には候補アイデンティティーと関連づけることができる。

【0126】

前記のように、プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作で得た結果の分析に有用な自動デバイスは、微生物のアイデンティティーとプローブマトリックス中の種々のアドレスにおける陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果とを相関させるルックアップ表を記憶させたメモリーデバイスを含む。本発明の実施に特に有用なアドレスには、下記のものが含まれる：（a）汎細菌生物に

由来するリボソーム核酸を検出するが、汎真菌生物に由来するものは検出しないアドレス；（b）汎真菌生物に由来するリボソーム核酸を検出するが、汎細菌生物に由来するものは検出しないアドレス；（c）グラム陽性細菌のリボソーム核酸とグラム陰性細菌のリボソーム核酸を識別するアドレス；ならびに（d）放線菌類サブセットのグラム陽性細菌に由来するリボソーム核酸を検出するアドレス。代表的なメモリーデバイスは、ハードドライブ、および磁気記憶媒体を含むフロッピー（登録商標）ディスクを含む。プローブマトリックスハイブリダイゼーション操作の結果を解釈するために用いた自動デバイスの1つは、ルックアップ表の蓄積の場として用いられるメモリーデバイスとして、コンピューター内部ハードドライブを用いた。

【0127】

プローブマトリックスの特定のアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は必ずしも標的核酸がプローブとして用いた配列の相補配列を厳密に含むことを指示するわけではないと理解すべきである。たとえば、プローブとrRNA標的配列の間に1つまたは少数のミスマッチがあるにもかかわらず、特定のプローブが実質的にすべての細菌種のrRNAをハイブリダイズするというのは事実であろう。これは、そのプローブ配列がそのクラスの微生物のゲノム中に必ずしも存在しなくても、特定のアドレスにおける陽性の結果はあるクラスの微生物の”診断用”となりうることを示す。本明細書中で用いる”診断用”とは、陽性のハイブリダイゼーション結果はハイブリダイズするポリヌクレオチドが特定の由来のものであることを指示すると言えるということを意味する。重要な点であるが、プローブと標的の厳密な適性塩基対合により得られる陽性のハイブリダイゼーションシグナルは対応するアドレスにおいて陽性の結果を与えるであろうが、逆の場合は必ずしも真実ではない。より具体的には、あるアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、必ずしも標的ポリヌクレオチドがプローブに対して完璧または完全に相補的な配列を含むことを証明するわけではない。

【0128】

微生物に由来するリボソーム核酸の分析に有用な自動デバイスは、メモリーデバイスに接続したプロセッサをも含むであろう。一部は、プロセッサは、ハ

ハイブリダイゼーションデータのプロフィールと、これらのハイブリダイゼーション結果を生じた可能性のあるリボソーム核酸を保有する微生物のアイデンティティとを相関させるアルゴリズムを達成するために用いられる。プロセッサは、ハイブリダイゼーション操作で得た多数の結果が陽性または陰性のいずれであるかを判定する基礎を提供するための定量分析をも行うことができる。この判定を行うために採用できる多様な方法があるが、好ましい方法はマトリックスの部分であるプローブ間の”部分-全体”関係を利用する。たとえば、ハイブリダイゼーション値が低い方の閾値より大きく、陰性の対照ハイブリダイゼーション値より少なくとも数倍大きい場合は、陽性の結果が指示されるであろう。各ハイブリダイゼーション結果が陽性または陰性と判定されると、結果のコレクションをプロフィールとして、すなわちメモリーデバイスに記憶させたルックアップ表と比較できる数値または”文字列 (string)”として、組み立てることができる。4アドレスプローブマトリックスに対する結果の文字列の例は、(1011) または (+/-/+/-) であり、ここで”1”または”+”は陽性のハイブリダイゼーション結果を表し、”0”または”-”は陰性のハイブリダイゼーション結果を表す。

【0129】

市販の表計算コンピューターソフトウェアを、比較アルゴリズムの実施に容易に適合させることができる。たとえばマイクロソフト社（ワシントン州レッドモンド）が販売しているEXCEL表計算プログラムを、プローブマトリックスハイブリダイゼーション結果の分析のための自動デバイスの一例を作製するのに特に用いた。このデバイス例に収容したルックアップ表の一部は下記の構造をもっていた：

<u>アドレス</u>							<u>出力</u>
1	2	3	4	5	6	7	
+	-	+	-	+	-	-	腸球菌
+	-	+	-	-	+	+	黄色ブドウ球菌
+	-	+	-	-	+	-	黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌(”SNA”)
+	-	+	-	-	-	+	肺炎連鎖球菌

＋ － ＋ － － － － グラム陽性細菌；放線菌類サブセットの
 グラム陽性細菌ではなく、腸球菌ではなく、
 ブドウ球菌属のメンバーではなく、かつ
 肺炎連鎖球菌ではない

所望により、分析デバイスにより得られた結果はルックアップ表からの結果に対応する候補生物のリストを提供してもよい。たとえば、候補生物を同定するためのコンピューターアルゴリズムは、デバイスオペレーターに候補生物のリストを提示するハイパーリンクを提供することができる。この例では、（＋／－／＋／－／＋／－／－）に対応するエントリーは、下記の候補生物として同定するハイパーリンクに接続させることができる：エンテロコッカス・カセリフラブス、エンテロコッカス・デュランス、エンテロコッカス・フェーカリス、エンテロコッカス・フェシウム、エンテロコッカス・ガリナラム、エンテロコッカス・ハイレおよびエンテロコッカス・ムンチイ。この候補生物リストは表6に示した情報から得られる。

【0130】

自動分析デバイスと共に使用できる出力デバイスには、過渡出力または恒久出力を提供するものが含まれる。過渡出力には、視覚表示モニターまたはスクリーン上に現れるものが含まれる。恒久出力には、プリントした記録、たとえばプロセッサに接続したプリンターにより作製されるものが含まれる。これらのタイプの出力デバイスそれぞれをプロセッサに接続し、これによりプロセッサに入力した結果とメモリーデバイスに記憶させたルックアップ表の比較結果を自動デバイスのユーザーまたはオペレーターに提供できることは、当業者に自明であろう。

【0131】

プローブマトリックスの具体例

プローブマトリックスの1形態は、菌血症または敗血症の原因として関与する頻度が最も高いものを含めた多様な微生物の同定に格別有用であることが認められた。敗血症は血流中に細菌が存在するものであり、多くの副次的外科手術の数時間後に起きる可能性がある。敗血症は急激な細菌増殖であり、血中に細菌毒素

が存在するのを特色とする。敗血症は常に重篤な致命的状態である。前記のように、これらのいずれかの状態を引き起こす生物の検出および同定に用いられる代表的な臨床検査は、無菌の血液ボトルに少量の患者血液を接種して血液中の在住微生物を増殖させることを伴う。この方法は、採血者が静脈血採血のために穿刺する予定の皮膚領域を十分に清浄にすることから始まる。この操作は、その領域をアルコールおよびヨウ素含有溶液で拭うことでとてもよい。血液ボトル内での微生物の増殖を監視するために使用できる自動システムの例には、B A C T E C 9 2 4 0 (B e c t o n D i c k i n s o n, メリーランド州スパークス)、B A C T / A L E R T (O r g a n o n T e k n i k a, ノースカロライナ州ダーラム) および E S P (D i f c o, ミシガン州デトロイト) が含まれる。数時間ないし数日間後、二酸化炭素を発生しているボトルを自動監視システムにより確認し、それらのボトルを開放し、ボトルに含有される生物をグラム染色、増殖要求についての標準代謝試験、または特定の検出可能な物質を分解する能力に関して調べる。二酸化炭素を少量しか発生しない微生物には、陽性のシグナルの引金を引くまでに5日間を必要とするものもある。汚染性の皮膚細菌が血液ボトルに導入された場合、または患者の血液試料が十分に多数の呼吸性白血球を含有する場合、偽陽性結果が得られることがしばしばある。菌血症および敗血症についてのこれまでの調査で、わずか約20の微生物種が血液ボトルからの分離株の95%を占めると結論された。したがって、臨床関連情報を与えることができるきわめて有用な検査装置を作製するために、すべての既知細菌種および真菌種の種を判定する能力をもつ必要はないことは明らかであろう。

【0132】

実施例1には、微生物同定のためのプローブマトリックス法の基礎となる操作の原理を証明するために用いた方法を記載する。この実施例では、既知のアイデンティティーをもつ対照微生物から得た精製rRNAコレクションまたはポリヌクレオチド含有溶解物を用いてハイブリダイゼーション反応を実施した。

【0133】

実施例1

プローブマトリックスハイブリダイゼーションを用いる対照微生物の同定

7つのハイブリダイゼーション容器（試験管またはマイクロタイターウェル）それぞれに、表5に示したようにA E標識プローブのコレクションおよび非標識ヘルパーオリゴヌクレオチドを入れた。各プローブは、1つの種の生物または特定の生物グループのrRNAに対して特異的であった。この操作では、表5に挙げた配列をもつアクリジニウムエステル標識プローブを下記のアドレスにより用いた：（1）汎細菌；（2）汎真菌；（3）グラム陽性菌；（4）放線菌類サブセットのグラム陽性菌；（5）腸内細菌科および腸球菌属；（6）ブドウ球菌属およびカンピロバクター属；ならびに（7）大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンス、緑膿菌および肺炎連鎖球菌に対する種特異的プローブ。各アドレスは約0.1 pmolの各A E標識プローブおよび約10 pmolの各ヘルパーオリゴヌクレオチドを含んでいた。約1.0～100 fmolの精製rRNA、またはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）もしくは本発明者らの研究室の微生物マスターストックから得た培養細菌に由来する、等量のrRNAを含有する溶解物を、マトリックス中の各アドレスに対するプローブの混合物に添加した。混合物を高ストリンジェント条件下でハイブリダイズさせた後、ハイブリダイズしていないプローブに結合している標識を不活性化し、特異的にハイブリダイズしたプローブを、本質的にArnoldら、米国特許第5,283,174号（その開示内容を前記において本明細書に援用した）に示された方法に従ってルミノメトリーにより定量した。

【0134】

表6に示した定量結果は、単一プローブマトリックスを用いて多数の異なる微生物が分類されることを示す。陰性対照反応で検出されたバックグラウンドシグナルより少なくとも2倍高い定量ハイブリダイゼーションシグナルを与えるアドレスを、陽性のハイブリダイゼーション結果を表すと判定した。表6の影付きエントリーはそこに指示されたアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果を表す。

【0135】

【表6】

表6
定性ハイブリダイゼーションの結果

		汎細菌 プローブ	汎真菌 プローブ	グラム陽性菌 プローブ	放線菌類 プローブ	腸内細菌および腸球菌	ブドウ球菌および バクテロイデス	種 プローブ
生物	GP#*							
バシラス・ブレビス (<i>Bacillus brevis</i>)	1180							
バシラス・サチリス (<i>Bacillus subtilis</i>)	20							
バクテロイデス・フラギリス (<i>Bacteroides fragilis</i>)	227							
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>)	PN 102395							
カンジダ・グラブラタ (<i>Candida glabrata</i>)	1123							
カンジダ・パラプシロシス (<i>Candida parapsilosis</i>)	1085							
シトロバクター・ダイバーサス (<i>Citrobacter diversus</i>)	845							
シトロバクター・フロインデイ (<i>Citrobacter freundii</i>)	408							
コリネバクテリウム・アクアティック (<i>Corynebacterium aquaticum</i>)	599							
コリネバクテリウム・ゼローシス (<i>Corynebacterium xerosis</i>)	552							
エンテロバクター・エロゲネス (<i>Enterobacter aerogens</i>)	722							
エンテロバクター・アグロメラランス (<i>Enterobacter agglomerans</i>)	723							
エンテロバクター・クロアケ (<i>Enterobacter cloacae</i>)	367							
エンテロバクター・ジェルゴビア (<i>Enterobacter gergoviae</i>)	724							
エンテロバクター・サカザキ (<i>Enterobacter sakazaki</i>)	157							
エンテロコッカス・アビウス (<i>Enterococcus avium</i>)	1174							
エンテロコッカス・カセリフラブス (<i>Enterococcus casseliflavus</i>)	999							

【0136】

【表7】

		汎細菌 プローブ	汎真菌 プローブ	グラム陽性菌 プローブ	放線菌類 プローブ	腸内細菌および腸球菌	ブドウ球菌および カンピロバクター	種 プローブ
生物	GP#*							
エンテロコッカス・セルコム (<i>Enterococcus cecorum</i>)	1400							
エンテロコッカス・ディスペア ー(<i>Enterococcus dispar</i>)	1398							
エンテロコッカス・デュランス (<i>Enterococcus durans</i>)	888							
エンテロコッカス・フェーカリ ス (<i>Enterococcus faecalis</i>)	1013							
エンテロコッカス・フェシウム (<i>Enterococcus faecium</i>)	1027							
エンテロコッカス・ガリナラム (<i>Enterococcus gallinarum</i>)	1000							
エンテロコッカス・ハレイ (<i>Enterococcus hirae</i>)	1001							
エンテロコッカス・ムンチイ (<i>Enterococcus mundtii</i>)	998							
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	88							
クレブシエラ・オキシトカ (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	727							
クレブシエラ・オゼネ (<i>Klebsiella ozaenae</i>)	728							
クレブシエラ・ニューモニエ (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	40							
クレブシエラ・リノスクレロマ チス (<i>Klebsiella</i> <i>rhinoscleromatis</i>)	242							
ラクトバシラス・アシドフィル ス (<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>)	818							
ラクトバシラス・ジェンセニイ (<i>Lactobacillus jensenii</i>)	1018							
リステリア・グラビ (<i>Listeria</i> <i>grayi</i>)	851							
リステリア・イバノビイ (<i>Listeria ivanovii</i>)	847							
リステリア・モノサイトゲネス (<i>Listeria monocytogenes</i>)	803							
リステリア・ゼーリゲリ (<i>Listeria seeligeri</i>)	895							

【0137】

リステリア・ウェルシュメリ (<i>Listeria welshimeri</i>)	1402							
マイクロコッカス・ルテウス (<i>Mycrococcus luteus</i>)	419							
結核菌 (<i>Mycobacteria tuberculosis</i>)	PN1013 97							
プロテウス・ミラビリス (<i>Proteus mirabilis</i>)	179							
プロテウス・ブルガリス (<i>Proteus vulgaris</i>)	181							
緑膿菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	736							
シュードモナス・セバシア (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	204							
シュードモナス・マルトフィリア (<i>Pseudomonas maltophilia</i>)	207							
サルモネラ・ティフィムリウム (<i>Salmonella typhimurium</i>)	166							
セラチア・リクファシエンス (<i>Serratia liquifaciens</i>)	170							
黄色ブドウ球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	1397							

【0138】

【表8】

		汎細菌 グループ	汎真菌 グループ	グラム陽性菌 グループ	放線菌類 グループ	腸内細菌および腸球菌	ブドウ球菌および バクテリア	種 グループ
生物	GP#*							
スタフィロкокカス・デルフィニ (Staphylococcus delphini)	1334							
表皮ブドウ球菌 (Staphylococcus epidermidis)	742							
スタフィロкокカス・ヘモリテिकास (Staphylococcus haemolyticus)	1221							
スタフィロкокカス・ホミニス (Staphylococcus hominis)	1222							
スタフィロкокカス・ヒイカス-ヒイカス (Staphylococcus hyicus-hyicus)	1347							
スタフィロкокカス・インターメディウス (Staphylococcus intermedius)	1223							
スタフィロкокカス・サプロフィテिकास (Staphylococcus saprophyticus)	743							
スタフィロкокカス・シミュランス (Staphylococcus simulans)	1225							
スタフィロкокカス・ワーネリ (Staphylococcus warneri)	1226							
ストレプトкокカス・アガラクティエ (Streptococcus agalactiae)	744							
ストレプトкокカス・アンギノーサス (Streptococcus anginosus)	1315							
ストレプトкокカス・アビウス (Streptococcus avium)	745							
ストレプトкокカス・ボビス (Streptococcus bovis)	922							
ストレプトкокカス・ディスガラクチエ (Streptococcus dysgalactiae)	249							
ストレプトкокカス・エクイ (Streptococcus equi)	1386							

ストレプトコッカス・エクイナス (Streptococcus equinus)	920						
ストレプトコッカス・エクイシミリシ (Streptococcus equisimilis)	1349						
ストレプトコッカス g r p G (Streptococcus grp G)	1194						
ストレプトコッカス g r p. C (Streptococcus grp. C)	1195						
ストレプトコッカス・ミュータンス (Streptococcus mutans)	1014						
肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae)	1172						
化膿連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes)	1170						
ストレプトコッカス・サリバリス (Streptococcus salivarius)	816						
ストレプトコッカス・サンガイ (Streptococcus sanguis)	1206						

【0140】

【表9】

		汎細菌 プローブ	汎真菌 プローブ	グラム陽性菌 プローブ	放線菌類 プローブ	腸内細菌および腸球菌	ブドウ球菌および バクテロイデス	種 プローブ
生物	GP#*							
ストレプトコッカス s p g r o u p F 2 (Streptococcus sp group F2)	1193							
ストレプトコッカス s p. g r o u p B t y p e I I I (Streptococcus sp. Group B type III)	1012							
ストレプトコッカス・ユベリウス (Streptococcus uberis)	250							

【0141】

”GP#”は、Gen-Probe社マスターログNo. による微生物を表す。

表6に示す結果から、ハイブリダイゼーション操作がマトリックス中の7つのアドレスそれぞれにおいて予想したパターンの結果を与えることが確認された。たとえば黄色ブドウ球菌に由来するrRNAは、マトリックスの汎細菌アドレス

において陽性のハイブリダイゼーションシグナルを与え、汎真菌アドレスにおいては陰性のハイブリダイゼーションシグナルを与えた。これにより、予想どおり黄色ブドウ球菌試料中に真菌由来の rRNA は存在しないことが確認された。グラム陽性菌アドレスにおける陽性のシグナルは、黄色ブドウ球菌がグラム陽性細菌であるという事実と一致した。放線菌類サブセットのグラム陽性細菌ならびに腸内細菌科および腸球菌グループに対応するアドレスにおける陰性の結果は、黄色ブドウ球菌が放線菌類として分類される細菌、または腸内細菌科もしくは腸球菌グループの細菌に属さないことを確認した。黄色ブドウ球菌はブドウ球菌属のメンバーであるので、カンピロバクターグループではなくても、これらのプローブに対応する第6アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は適切である。この後者の結果は、特定のアドレスにおける複数のプローブのうちのいずれか1つについての陽性のハイブリダイゼーションが陽性の結果を与えることを例示する。最後に、種特異的プローブのコレクションに対応する第7アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーションシグナルは適切であった。この座には黄色ブドウ球菌の種特異的プローブが含まれるからである。

【0142】

重要な点であるが、5つの種特異的プローブに対応するアドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果をマトリックスにおける他の結果と分離して考慮すると、曖昧なデータ解釈が可能であるにすぎない。より具体的には、この結果は、ハイブリダイズした rRNA (1以上) が大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンス、緑膿菌および肺炎連鎖球菌により与えられる種のうちの少なくとも1つであったことを示すであろう。しかし、ハイブリダイゼーションマトリックスにおける他の結果との関連で考えると、マトリックスにおける他の結果によりこれらの種のうちあるものは排除されることが明らかになる。たとえば汎真菌アドレスにおける陰性の結果は、ハイブリダイズした rRNA が酵母カンジダ・アルビカンス由来のものではあり得ないことを意味する。同様に、腸球菌属および腸内細菌科に対する陰性の結果は、種特異的アドレスにおいてハイブリダイズした rRNA が腸内細菌である大腸菌由来のものではあり得ないことを意味する。ブドウ球菌属およびカンピロバクターグループのプローブに対応するマト

リックスの第6アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果は、種特異的地址アドレスにおける陽性のハイブリダイゼーション結果が緑膿菌または肺炎連鎖球菌のいずれによるものでもなかったことを意味する。これらの生物は、ブドウ球菌属およびカンピロバクターグループに対応するアドレスにおいて陰性のハイブリダイゼーション結果を与えたはずだからである。これは、ある生物に由来する rRNA が前記のプロブマトリックス法を用いると明瞭なパターンのハイブリダイゼーション結果を与えることを説明する。

【0143】

重要な点であるが、表6は、表中の定性ハイブリダイゼーションプロフィールのうちの1つにより特徴づけられる生物のアイデンティティを復号するために利用できるルックアップ表でもある。たとえば、表6を参照すると、この表の7つのアドレスにおける陽性および陰性のハイブリダイゼーション結果に対応する“(+/−/+/−/−/+/+)”により与えられるプロフィールは、微生物を黄色ブドウ球菌と同定することが明らかである。

【0144】

本発明の開発に際して、意外にもマトリックスに基づく微生物同定方法は混合微生物試料中に含有される微生物のアイデンティティをも解明できることが見出された。より具体的には、微生物実験室で栄養寒天平板上に増殖させた、分離十分と思われたコロニーですら、しばしば1種より多い微生物を含有していたことが見出された。このように1種より多い生物の存在を検出できること、およびさらに分離または精製の工程なしでこれらの生物のアイデンティティを判定できることは、他の分子診断法に優る本発明の利点を強く証明する。たとえば、異なる生物に由来する rRNA または rDNA を表す鋳型の混合物のポリヌクレオチド配列は曖昧な結果を与え、これらの結果を信頼性をもって個々の配列にソーティングすることはできないであろう。同様に、より包括性の低いハイブリダイゼーション方式（陰性のハイブリダイゼーションシグナルからは確定結果が得られない方式を含む）を用いたプロブに基づく微生物同定方法は、第1の種特異的プロブにより陽性のハイブリダイゼーション結果が達成されると、第2生物の存在を見過ごす可能性がある。したがって、本明細書に開示する方法は、他の

方法では実施できない分析を実施するために利用できる。

【0145】

マトリックスに基づく生物同定方法において得られる結果がもつ定量性は、プローブが標的ポリヌクレオチドに結合できなかった陰性のハイブリダイゼーション結果から推論を引き出しうることに共に、本発明のこの独自の属性の基礎である。事実、マトリックスハイブリダイゼーション操作の結果を汎細菌アドレスまたは汎真菌アドレスにおいて測定したシグナルに対して正規化すると、ある微生物混合物を1回のハイブリダイゼーション操作で解明できるのに十分なほど、この系を定量的にすることができる。

【0146】

実施例2に、マトリックスに基づく微生物同定方法が微生物混合物を検出および解明しうることを証明する方法を記載する。

実施例2

混合微生物培養物の解明

数種類の対照細菌 rRNA 試料を、実施例1に記載した7アドレスプローブマトリックスにより試験した。3つの異なる菌株の化膿連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*) (A~C株) に由来する rRNA を含有する溶解物を、プローブマトリックスにおいて試験した。Arnoldら、米国特許第5,283,174号に開示されたハイブリダイゼーションおよび定量の操作を用いて、異なるアドレスにおいてプローブが結合した標的 rRNA を定量した。同種細菌の第4菌株 (D株) も同じ方法で試験した。

【0147】

表7に、プローブマトリックスの各アドレスにおけるハイブリダイゼーションシグナルを指示する正規化した定量結果を示す。7つのアドレスにおける化膿連鎖球菌A~C株についての平均相対光単位 (Relative Light Unit (RLU)) 読みを表の第1列に示す。化膿連鎖球菌D株について得た結果を表の第2列に示す。すべての数値がそれぞれの汎細菌アドレスにおいて得た読みに対して正規化されている。この場合、汎細菌シグナルの20%より大きい正規化数値を陽性とみなした。

【0148】

【表10】

表 7

プローブマトリックス分析による混合細菌培養物の解明

試料	汎細菌	汎真菌	グラム陽性菌	高(G+C)	腸内細菌；腸球菌	ブドウ球菌；カンピロバクター	種アドレス
化膿連鎖球菌株A-C (平均, n=3)	100	0.5	31	1.0	1.3	0.8	2.5
化膿連鎖球菌株D	100	0.5	51	0.8	1.5	29	2.3

【0149】

* 数値は汎細菌アドレスにおいてみられたハイブリダイゼーションシグナルに対して正規化されており、%として示される。

表7に示すように、3つの異なる菌株の化膿連鎖球菌（A～C株）に関する正規化平均値は、汎細菌アドレスおよびグラム陽性菌アドレスにおいて陽性のハイブリダイゼーション結果を示すプロファイルを与えた。これに対し、この菌種の第4菌株（D株）は汎細菌、グラム陽性、およびブドウ球菌属／カンピロバクターグループのアドレスにおいて陽性の結果を示すプロファイルを与え、他の菌株の平均値と比較してわずかに高い相対シグナルをグラム陽性菌アドレスにおいて示した。化膿連鎖球菌はブドウ球菌属またはカンピロバクターグループのメンバーではないグラム陽性細菌であるので、ブドウ球菌属／カンピロバクターのアドレスにおいてみられた陽性のハイブリダイゼーションシグナルは化膿連鎖球菌以外の汚染細菌に由来するハイブリダイゼーション性 rRNA の存在によるものにちがいないことは明らかであった。カンピロバクター属細菌はグラム陰性であり、ブドウ球菌属細菌はグラム陽性であり、グラム陽性菌アドレスにおける相対シグナルが増大し、低下してはいないことを考慮すると、ハイブリダイゼーションのための rRNA の調製に用いた出発細菌試料中に汚染菌としてグラム陽性ブドウ球菌が存在したにちがいないと結論される。マトリックス中の種アドレスに存在する種特異的黄色ブドウ球菌プローブが陽性のハイブリダイゼーションシグナ

ルを与えなかったので、汚染細菌は黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属細菌、すなわち”SNA”であるにちがいないと結論される。これは、マトリックスに基づく生物同定方法が微生物混合物を解明できることを具体的に示す。他の混合微生物集団の多数の例も、この手法で解明された。

【0150】

前記のように、少なくともある場合には、混合集団中に存在する微生物のアイデンティティーを解明するためにマトリックスに基づく微生物同定方法を有利に使用できる。この方法の定量性を証明するために、(a) 対照細胞溶解物の混合物を用いて得た実際のハイブリダイゼーション結果と (b) 分離した対照を用いて得た結果に基づくハイブリダイゼーションについて推定した定量値とを比較するための実験を行った。実験の第1部では、3種の細菌からの既知量の溶解物を混和し、標準的なプローブマトリックスハイブリダイゼーション操作に従ってハイブリダイズさせた。第2部の操作では、rRNA含有溶解物の混合物を調製し、同じハイブリダイゼーション操作を施した。これらの混合試料から得た結果を、混合物中の各成分が比例して関与するという前提で予想した数値と比較し、混合試料を定量的に解明できることを示した。下記の操作例では培養微生物から別個に調製した細胞溶解物の混合物を用いたが、微生物の混合培養物から調製した溶解物も同様な結果を与えることが理解されるであろう。

【0151】

実施例3は、2種類の異なる微生物に由来する核酸試料をプローブマトリックスハイブリダイゼーションプロトコルにより定量的に解明できることを証明する方法を記載する。

【0152】

実施例3

ポリヌクレオチドプローブマトリックスを用いた微生物混合集団の解明

3種類の異なるrRNA含有細菌溶解物を調製し、実施例1に記載したプローブマトリックスハイブリダイゼーションおよび検出の操作を行った。エンテロコッカス・フェーカリス(ATCC#29212; グラム陽性腸球菌)、ストレプトコッカス・ユベリス(*Streptococcus uberis*) (ATC

C # 2 7 9 5 8 ; グラム陽性細菌)、および大腸菌 (A T C C # 1 0 7 9 8 ; 腸内細菌科のグラム陰性メンバー) をこれらの操作で r R N A 源として用いた。大腸菌、カンジダ・アルビカンス、黄色ブドウ球菌およびマイコバクテリウム・ケローネ (M. c h e l o n a e) を陽性のハイブリダイゼーション対照として用い、一方、ハイブリダイゼーション緩衝液を陰性の対照として用いた。1 0 0 μ l のハイブリダイゼーション反応液中に用いた r R N A 含有溶解物の体積を 5 0 μ l に一定に維持した。表 8 は、3 種類の細菌溶解物をそれぞれ別個に用いて得た定量ハイブリダイゼーション結果を示す。

【0153】

【表11】

表 8

細菌溶解物対照を用いたプローブマトリックス
ハイブリダイゼーション (RLU)

アドレス	プラス対照	マイナス対照	ストレプトコッカス・ユベリス	大腸菌	エンテロコッカス・フェーカリス
汎細菌	152480	603	86520	35860	79210
汎真菌	44200	760	628	603	595
グラム陽性菌	90390	873	47270	818	44730
高 (G+C)	90680	1173	1020	1132	1038
腸内細菌/ 腸球菌	31560	2113	1810	29040	37600
連鎖球菌/ カンピロバクター	26060	883	822	817	803
種プローブ	100790	2116	1854	32390	1784

【0154】

体積比 4 : 1、1 : 1 および 1 : 4 で混和したエンテロコッカス・フェーカリスおよびストレプトコッカス・ユベリスの溶解物を用いて、同様にハイブリダイゼーションおよび検出の操作を行った。大腸菌溶解物とストレプトコッカス・ユベリス溶解物も同様に比率 1 : 1 および 1 : 4 で混和し、次いでハイブリダイゼーション操作に用いた。これらの混合試料を用いて得た結果を表 9 に示す。

【0155】

【表12】

表 9

種々の割合で混和した細菌溶解物についての
ハイブリダイゼーション結果 (RLU)

アドレス	<i>Ef/Su</i> (4:1)	<i>Ef/Su</i> (1:1)	<i>Ef/Su</i> (1:4)	<i>Ec/Su</i> (4:1)	<i>Ec/Su</i> (1:1)	<i>Ec/Su</i> (1:4)
汎細菌	84500	88730	85000	47710	60500	72950
汎真菌	715	675	647	637	669	624
グラム陽性菌	48960	45850	46480	9064	23350	37440
高 (G+C)	1120	1094	1162	1013	1027	1028
腸内細菌/ 腸球菌	34070	23080	10542	24130	17030	8066
連鎖球菌/ カンピロバクター	900	860	783	850	812	817
種プローブ	2470	2414	2005	26610	17410	8433

【0156】

E c : 大腸菌

E f : エンテロコッカス・フェーカリス

S u : ストレプトコッカス・ユベリス

最後に、表9に示したRLU実測値を、表8に示した数値結果の比例組合わせに基づいて予想した数値と比較した。この比較結果を%として表10に示す。

【0157】

【表13】

表 10

測定値に対する%としての推定ハイブリダイゼーション結果

アドレス	<i>Ef/Su</i> (4:1)	<i>Ef/Su</i> (1:1)	<i>Ef/Su</i> (1:4)	<i>Ec/Su</i> (4:1)	<i>Ec/Su</i> (1:1)	<i>Ec/Su</i> (1:4)
汎細菌	95	93	100	96	101	105
汎真菌	na	na	na	na	na	na
グラム陽性菌	92	100	101	112	103	101
高 ₊ (G+C)	na	na	na	na	na	na
腸内細菌/ 腸球菌	89	85	85	98	91	90
連鎖球菌/ カンピロバクター	na	na	na	na	na	na
種プローブ	na	na	na	99	98	94

【0158】

E c : 大腸菌

E f : エンテロコッカス・フェーカリス

S u : ストレプトコッカス・ユベリス

n a : ”適用できず”

表10に示した結果は、マトリックスに基づく方法でのプローブハイブリダイゼーションについて計算値と実測値が密接に対応することを証明する。事実、ハイブリダイゼーションについての実測値と推定値は、互いに約15%より大きな差がなかった。これは、プローブマトリックスに基づくハイブリダイゼーション操作は混合物中に含有される異なる微生物種に由来するrRNAの相対関与を反映した定量ハイブリダイゼーションデータの導出に使用できるということを証明した。したがって、マトリックスに基づくハイブリダイゼーションプロトコルは、微生物混合集団中の異なる微生物の相対関与の判定に利用できる。

【0159】

下記の実施例は、マトリックスに基づく微生物同定方法を利用して敗血症を診断できることを記載する。

実施例4

マトリックスに基づく微生物同定方法を用いた敗血症診断

血流感染症を伴う疑いのあるヒト患者を、まず医師が確認する。標準医療処置に従ってアルコールおよびヨウ素溶液で清浄にした部位の患者の皮膚から静脈血試料を採取する。この試料を血液培養ボトルの接種に用い、次いで37℃に保持し、自動インキュベーター内でCO₂産生を監視する。2日後、培養物は混濁を示し、ガス産生微生物を含有することが肉眼で判定される。培養ボトルから取り出した液体試料を選択遠心分離工程で処理して(Davis et al., J. Clin. Microbiol., 29:2193 (1991))、微生物を採集する。まず、ボトルからブロス1.5mlの試料を取り出し、約9,600×gで2秒間遠心分離して、赤血球を沈降させる。上清を分離し、9,600×gで1分間遠心分離して、微生物を濃縮する。得られたペレットを実験室標準法で細胞溶解し、放出されたポリヌクレオチドを実施例1に記載した7アドレスプローブマトリックスによるマトリックスに基づくハイブリダイゼーション操作で処理する。汎真菌アドレスと、大腸菌、黄色ブドウ球菌、カンジダ・アルビカンズ、緑膿菌および肺炎連鎖球菌に対する種特異的プローブに対応するアドレスにおいてのみ、陽性のハイブリダイゼーションシグナルが検出される。これらの結果に基づいて、患者の血液はカンジダ・アルビカンズを宿していると結論される。直ちに適切な抗真菌療法を開始すると、患者の状態が改善される。

【0160】

本明細書に記載するように、本発明のマトリックスに基づく微生物同定方法は、明らかに増幅および配列決定プロトコルの正確さを備え、かつプローブハイブリダイゼーション方法の簡便さと簡潔さを備えた、種レベルの微生物同定方法を提供することができる。しかも、このマトリックスに基づく微生物同定方法はさらに、微生物混合培養物中に含まれる微生物のアイデンティティを解明することができる。さらに、このマトリックスに基づく微生物同定方法は陰性のハイブリダイゼーション結果からも意味ある情報を導き出すことができる。これは他の分子診断方法にはない特徴である。

【0161】

本発明をその多数の具体的な例および態様に関して記載した。もちろん、以上

の詳細な記述を参照すると、当業者には本発明の多種多様な態様が容易に理解されるであろう。したがって本発明の真の範囲は特許請求の範囲の記載に基づいて決定される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> Gen-Probe Incorporated

<120> Polynucleotide Matrix-Based Method of
      Identifying Microorganisms

<130> GP101-PCT

<150> US 60/132,411
<151> 1999-05-03

<150> US 60/150,149
<151> 1999-08-20

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 16
<212> DNA
<213> pan-bacterial

<400> 1
cgacaaggaa tttcgc                                     16

<210> 2
<211> 17
<212> DNA
<213> pan-bacterial

<400> 2
taccttagga ccggttat                                   17

<210> 3
<211> 16
<212> DNA
<213> pan-bacterial

<400> 3
caggtcggaa cttacc                                     16

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> pan-fungal

<400> 4
gtctggacct ggtgagtttc cc                             22

```

<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> pan-fungal	
<400> 5	
cggtgtgagt caaattaagc cgc	23
<210> 6	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> pan-fungal	
<400> 6	
gctctcaatc tgtcaatcct tattgt	26
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Gram(+) bacteria	
<400> 7	
gagggaaacct ttgggcgc	18
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Gram(+) bacteria	
<400> 8	
ctccgttacc ttttaggagg cgaccgccc	29
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Gram(+) bacteria	
<400> 9	
ctccgttaca ttttaggagg c	21
<210> 10	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Actinomycetes [High (G+C)] bacteria	
<400> 10	
cgagcatctt tactcgtagt gcaatttcg	29


```

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Actinomycetes [High (G+C)] bacteria

<400> 11
ccgagtctgt ggttgagaca gtggg                25

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> Actinomycetes [High (G+C)] bacteria

<400> 12
ggtctttccg tcctgccg cgtaa                25

<210> 13
<211> 17
<212> DNA
<213> Enterobacteriaceae

<400> 13
ccgcttgctc tcgcgag                17

<210> 14
<211> 41
<212> DNA
<213> Enterobacteriaceae

<400> 14
gtcgcttctc ttgtatgcg ccattgtagc acgtgtgtag c    41

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Enterobacteriaceae

<400> 15
ggactacgac gcactttatg aggt                24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Enterococcus

<400> 16
ctectaggtg ccagtcaa tttg                24

```

<210> 17	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Enterococcus	
<400> 17	
tctacggggc ttttaccctt tctagcagac c	31
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Enterococcus	
<400> 18	
cctcgtgttc cgccgtactc aggatc	26
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Enterococcus	
<400> 19	
catcattctc aattccgagg c	21
<210> 20	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> Enterococcus	
<400> 20	
tagccctaaa gctatttcgg agagaaccag ctatctcc	38
<210> 21	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Enterococcus	
<400> 21	
ccctagtcca aacagtgttc tacctc	26
<210> 22	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus genus	
<400> 22	
ccgaactgag aacaacttta tgggatttgc	30

<210> 23	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus genus	
<400> 23	
ttgacctcgc ggtttcgc	17
<210> 24	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus genus	
<400> 24	
gcgattccag cttcatgtag tcgagttgca gactacaat	39
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Campylobacter spp	
<400> 25	
ggttcttagg atatcaagcc cagg	24
<210> 26	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Campylobacter spp	
<400> 26	
gtctctaagt tctagcaagc tagcaccctc atatctcta	39
<210> 27	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> E. coli	
<400> 27	
gggtaacgtc aatgagcaaa ggtattaac	29
<210> 28	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> E. coli	
<400> 28	
tttactccct tcctccccgc tgaaagtact ttacaaccgc	40

<210> 29	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> E. coli	
<400> 29	
cacggagtta gccggtgctt cttctgc	27
<210> 30	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Streptococcus pneumoniae	
<400> 30	
caaagcctac tatggttaag cc	22
<210> 31	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Streptococcus pneumoniae	
<400> 31	
acagccttta acttcagact tatctaaccg cctgcgc	37
<210> 32	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Streptococcus pneumoniae	
<400> 32	
tctccctct tgcaactcaag ttaaacagtt tc	32
<210> 33	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas aeruginosa	
<400> 33	
cccagagtga tacatgaggc g	21
<210> 34	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Pseudomonas aeruginosa	
<400> 34	
ccctagccga aacagttgct ctaccc	26

<210> 35	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<400> 35	
ctacctaagt agcttttcgag gagaaccagc tatctc	36
<210> 36	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> <i>Candida albicans</i>	
<400> 36	
gctggcctga aaaatcaagc acg	23
<210> 37	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> <i>Candida albicans</i>	
<400> 37	
ttgaaacgga gcttccccat ctcttaggat cgactaaccc	40
<210> 38	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> <i>Candida albicans</i>	
<400> 38	
ccaagtccg gaattttaac cggattccct ttcgatg	37
<210> 39	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
<400> 39	
ccactcaaga gagacaacat ttctgactac	30
<210> 40	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
<400> 40	
gatgattcgt ctaatgtcga cctttgtaac tcc	33
<210> 41	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> <i>Staphylococcus aureus</i>	
<400> 41	
cggaatttca cgtgctccgt cgtactcagg at	32

<210> 42	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 42	
ggtagcgctg agacatatcc tcc	23
<210> 43	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 43	
ccgtaacca cgacatttc tgtactgcct ctcagccg	38
<210> 44	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 44	
cacaaccccg cacacacaac ccctaccgg ttaccc	36
<210> 45	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 45	
cagaactcca caccgccgaa g	21
<210> 46	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 46	
tgattcgtca cgggcgccca cacacgggta cgggaatc aaccc	45
<210> 47	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 47	
ctactaccag ccgaagttcc cagcagccc	30
<210> 48	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 48	
ggagttgatc gatccggttt tgggtgggta gtaccgc	37

<210> 49	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> TB Complex	
<400> 49	
ggggtacggg ccgtgtgtgt gctcgctaga ggcttttctt ggc	43
<210> 50	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> <i>Listeria monocytogenes</i>	
<400> 50	
ctgagaatag ttttatggga ttagctcc	28
<210> 51	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> <i>Listeria monocytogenes</i>	
<400> 51	
ggcgagttgc agcctacaat ccgaa	25
<210> 52	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> <i>Candida albicans</i>	
<400> 52	
cgccataaa gacctaccaa gcg	23
<210> 53	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> <i>Candida albicans</i>	
<400> 53	
ccagttctaa gttgatcggt aaacgtgccc cgga	34
<210> 54	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> <i>Candida albicans</i>	
<400> 54	
tgtctacagc agcatccacc agcagtcctg cgtg	34
<210> 55	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> <i>Candida spp</i>	
<400> 55	
gcgtcaataa aagaacaaca accgatccc	29

<210> 56	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Candida spp	
<400> 56	
tagtcgcat agtttatggt taagac	26
<210> 57	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Candida spp	
<400> 57	
cccagaaccc aaagactttg atttctcgtg aggtgccgat t	41
<210> 58	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> pan-bacterial	
<400> 58	
ggaacttacc cgacaaggaa ttctgctacc ttagg	35
<210> 59	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> pan-bacterial	
<400> 59	
accgttatag ttacggccgc cgtttaccgg ggcttc	36
<210> 60	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> pan-bacterial	
<400> 60	
gcctggccat cattacgcca ttctgtcagg tc	32
<210> 61	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> pan-bacterial	
<400> 61	
gcccaaactg ttacgccttt cgtgcgggtc	30

【図面の簡単な説明】

【図1】

系統発生ヒエラルキーを示す模式図である。腸内細菌科はグラム陰性細菌サブセットであることが示され、一方グラム陽性細菌のクラスは低（G+C）および高（G+C）サブセットに分類される。汎真菌プローブは、汎細菌プローブにより同定される生物とは関連のないことが示される生物を同定する。矢印は系統発生関係を示す。

【図2】

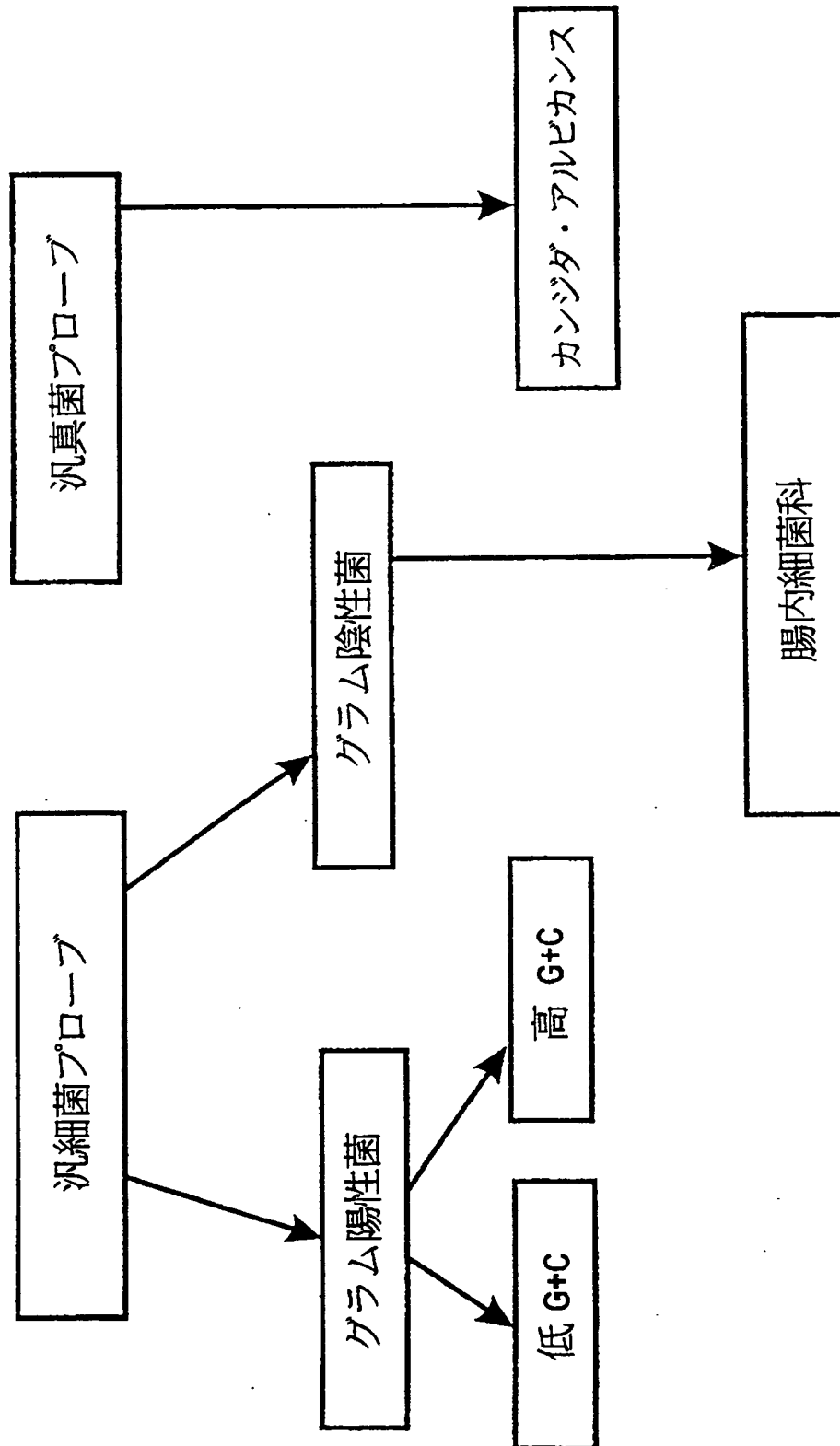
グラム陽性細菌間の系統発生ヒエラルキーを示す模式図である。グラム陽性細

菌の高（G + C）サブセットはマイコバクテリウム属を含むことが示され、一方、低（G + C）サブセットのグラム陽性細菌にはブドウ球菌属、連鎖球菌属および腸球菌属が含まれる。矢印は系統発生関係を示す。

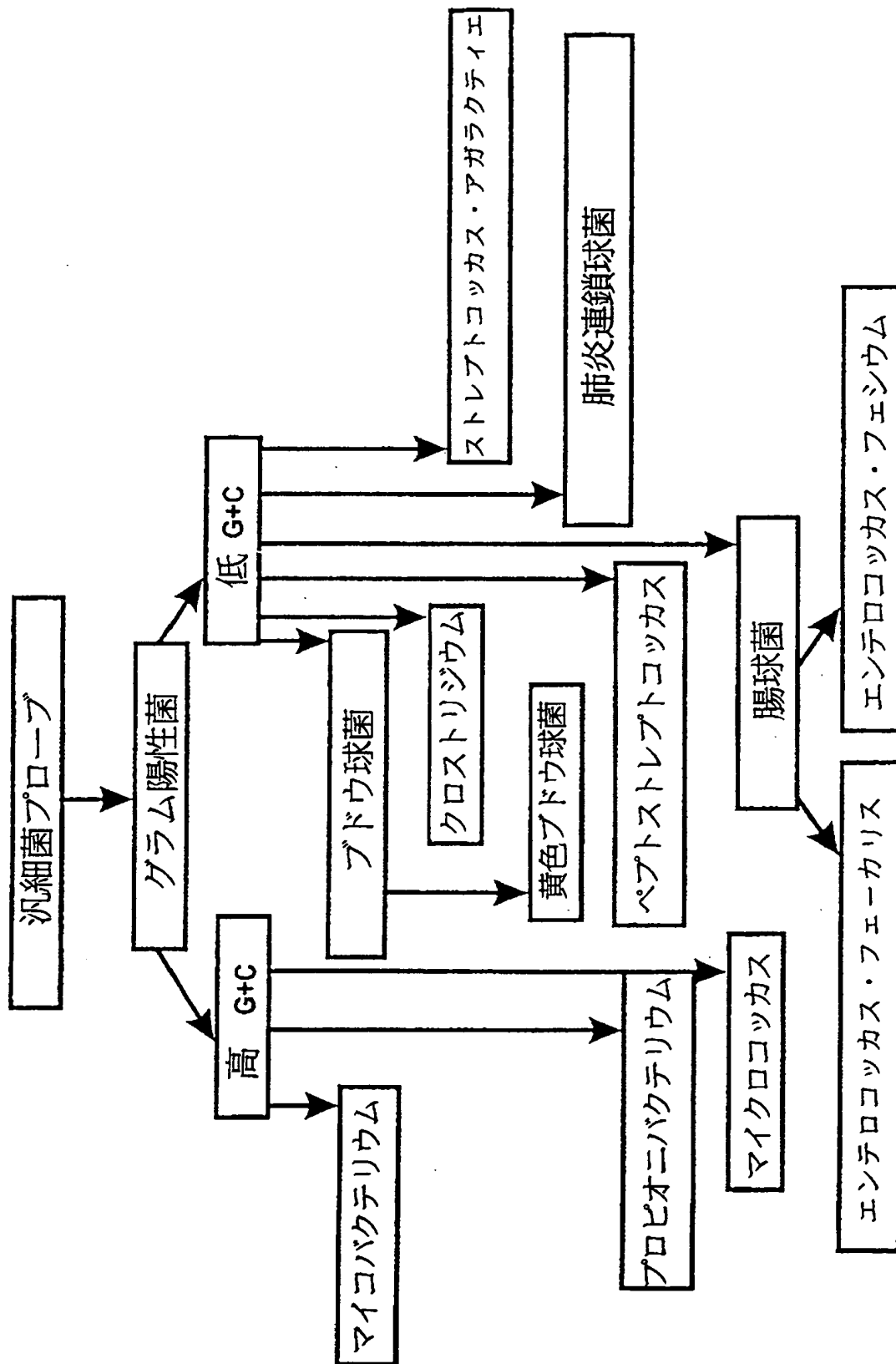
【図3】

グラム陰性細菌間の系統発生ヒエラルキーを示す模式図である。数種のグラム陰性細菌が腸内細菌科の細胞と関連することが示される。矢印は系統発生関係を示す。

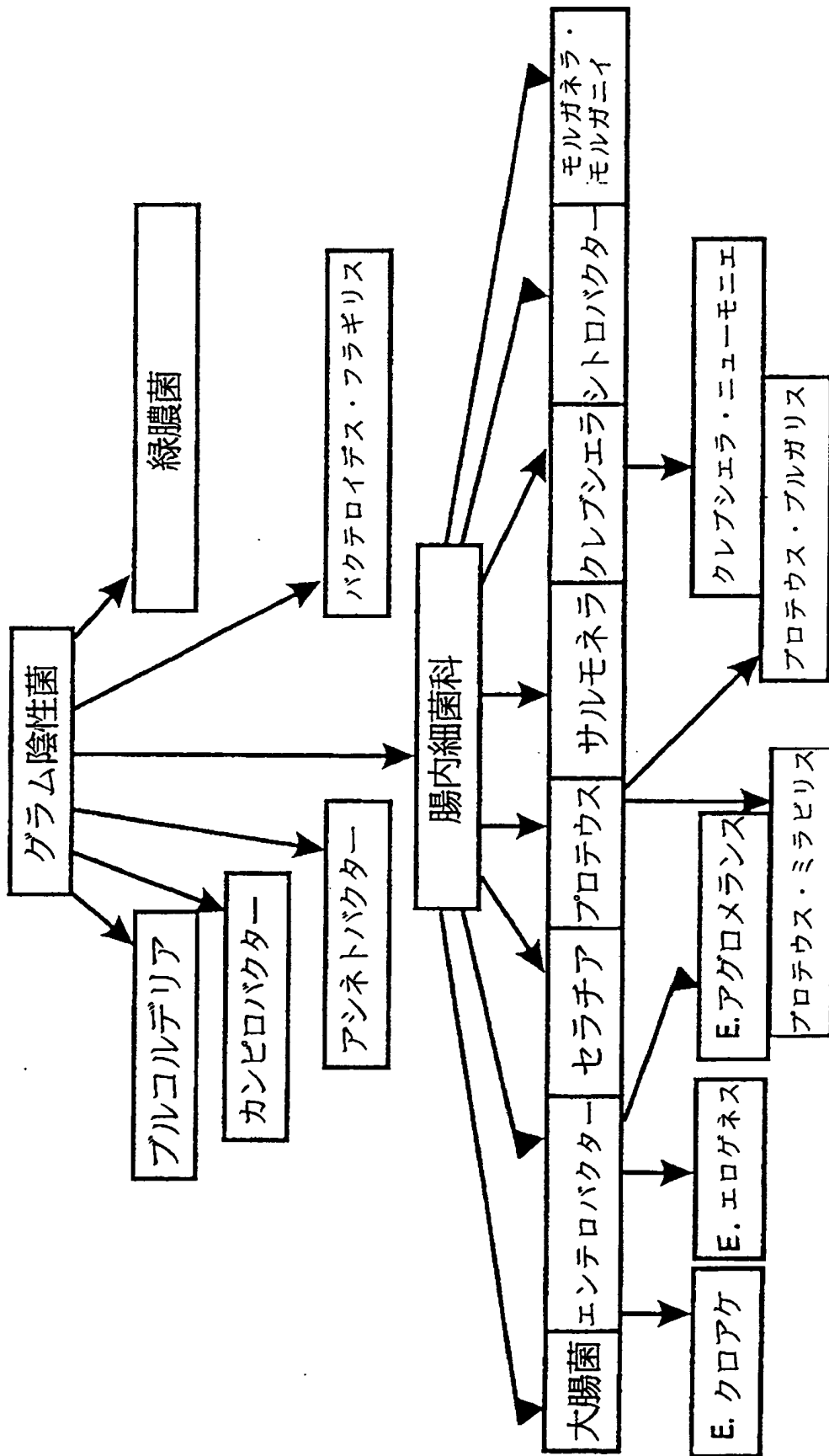
【図1】



【図2】



【図3】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten. Application No PCT/US 00/12421	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 801J19/00 606F19/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	WO 98 28444 A (UNIV CHICAGO) 2 July 1998 (1998-07-02)
Y	See especially page 24-page 36. the whole document
Y	WO 97 29212 A (GINGERAS THOMAS A ;CHEE MARK S (US); STRYER LUBERT (US); AFFYMETRI) 14 August 1997 (1997-08-14) the whole document
	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 December 2000	Date of mailing of the international search report 05/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3018	Authorized officer Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 00/12421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TROESCH ET AL: "MYCOBACTERIUM SPECIES IDENTIFICATION AND RIFAMPICIN RESISTANCE TESTING WITH HIGH-DENSITY DNA PROBE ARRAYS" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 37, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 49-55, XP002130858 ISSN: 0095-1137 the whole document	1-56
Y	GINGERAS THOMAS R ET AL: "Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic Mycobacterium DNA arrays." GENOME RESEARCH, vol. 8, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 435-448, XP002156298 ISSN: 1088-9051 the whole document	1-56
Y	WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 13 December 1990 (1990-12-13) the whole document	1-56
Y	WO 88 03957 A (GEN PROBE INC) 2 June 1988 (1988-06-02) the whole document	1-56
Y	DATABASE GCG_GENESSEQ_D 'Online! ID V79487; ID/AC: V79487, 30 July 1997 (1997-07-30) BARASH ET AL.: "EP786519/Staphylococcus aureus contig Seq.ID #5176" XP002156295 the whole document	31, 35, 37, 41, 56
Y	DATABASE GCG_GENESSEQ_D 'Online! ID/AC: V77731, 30 July 1997 (1997-07-30) BARASH ET AL.: "EP786519/Staphylococcus aureus contig Seq.ID #3420" XP002156296 abstract	31, 36, 37, 41, 56
Y	DATABASE GCG_GENESSEQ_D 'Online! ID/AC: V79340, 30 July 1997 (1997-07-30) BARASH ET AL.: "EP786519/Staphylococcus aureus contig Seq.ID #3149" XP002156297 abstract	31, 33, 37, 41, 56
Y	WO 96 22392 A (GEN PROBE INC) 25 July 1996 (1996-07-25) the whole document	33, 37
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/12421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 422 872 A (GENE TRAK SYSTEMS) 17 April 1991 (1991-04-17) the whole document	34, 37
Y	US 5 593 836 A (NIEMIEC JOHN T ET AL) 14 January 1997 (1997-01-14) the whole document	34, 37
A	WO 88 06189 A (SDI DIAGNOSTICS INC ;SINTRO CORP (US)) 25 August 1988 (1988-08-25) the whole document	
P, Y	FULLER D D ET AL: "Comparison of an rRNA probe matrix to conventional methods for rapid identification of clinically significant bacteria and fungi recovered from blood culture specimens." ABSTRACTS OF THE INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND vol. 39, 1999, page 221 XP002156294 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; San Francisco, California, USA; September 26-29, 1999, 1999 the whole document	1-56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/12421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828444 A	02-07-1998	AU 5716098 A	17-07-1998
		EP 0951569 A	27-10-1999
WO 9729212 A	14-08-1997	AU 2189397 A	28-08-1997
		EP 0937159 A	25-08-1999
		JP 2000504575 T	18-04-2000
WO 9015157 A	13-12-1990	AT 127530 T	15-09-1995
		AU 5950690 A	07-01-1991
		CA 2031499 A	01-12-1990
		DE 69022180 D	12-10-1995
		DE 69022180 T	01-02-1996
		EP 0431149 A	12-06-1991
		JP 4500315 T	23-01-1992
		US 5401631 A	28-03-1995
WO 8803957 A	02-06-1988	AU 651371 B	21-07-1994
		AT 163680 T	15-03-1998
		AU 616646 B	07-11-1991
		AU 1041988 A	16-06-1988
		AU 8388291 A	19-12-1991
		CA 1339871 A	19-05-1998
		DE 3752172 D	09-04-1998
		DE 3752172 T	02-07-1998
		DK 413788 A	23-09-1988
		EP 0272009 A	22-06-1988
		ES 2112824 T	16-04-1998
		FI 883482 A	22-07-1988
		JP 10042880 A	17-02-1998
		JP 1503356 T	16-11-1989
		KR 9511719 B	09-10-1995
		NO 883248 A	23-09-1988
		PT 86204 A,B	01-12-1987
		US 5541308 A	30-07-1996
		US 5595874 A	21-01-1997
		US 5547842 A	20-08-1996
		US 5593841 A	14-01-1997
		US 5683876 A	04-11-1997
		US 5677127 A	14-10-1997
		US 5677128 A	14-10-1997
		US 5677129 A	14-10-1997
		US 5827651 A	27-10-1998
		US 5693468 A	02-12-1997
		US 5958679 A	28-09-1999
		US 5691149 A	25-11-1997
		US 5693469 A	02-12-1997
		US 5679520 A	21-10-1997
		US 5714321 A	03-02-1998
		US 5674684 A	07-10-1997
		US 5840488 A	24-11-1998
		US 6150517 A	21-11-2000
WO 9622392 A	25-07-1996	AT 194391 T	15-07-2000
		AU 689375 B	26-03-1998
		AU 4764496 A	07-08-1996
		CA 2209991 A	25-07-1996
		DE 69609161 D	10-08-2000
		EP 0805876 A	12-11-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/12421

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9622392	A		ES 2150103 T JP 10503382 T US 6074826 A	16-11-2000 31-03-1998 13-06-2000
EP 0422872	A	17-04-1991	AU 6390490 A CA 2025181 A JP 3168085 A US 5324632 A	18-04-1991 13-04-1991 19-07-1991 28-06-1994
US 5593836	A	14-01-1997	NONE	
WO 8806189	A	25-08-1988	AU 1363688 A	14-09-1988

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード (参考)
G O 1 N 33/566		G O 1 N 37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 R 1:01	
/(C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A F
C 1 2 R 1:01)			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW